

Auswirkungen ausgewählter *REEP1*-Mutationen auf das Spleißen von prä-mRNA

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Annett Katrin Börner

geboren am 08.03.1990 in Elsterwerda

Gutachter

1. Prof. Dr. Christian Hübner, Jena
2. Prof. Dr. Ingo Kurth, Aachen
3. PD Dr. Thomas Liehr, Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.11.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Das <i>REEPI</i> -Gen	3
2.1.1 Allgemeines	3
2.1.2 Vorkommen in der Zelle	3
2.1.3 Expression von <i>REEPI</i> in Geweben	3
2.2 Mit <i>REEPI</i> assoziierte Krankheitsbilder	4
2.2.1 Hereditäre spastische Paraplegien – eine Übersicht	4
2.2.1.1 Epidemiologie	4
2.2.1.2 Klinisches Bild	4
2.2.1.3 Genetik	5
2.2.1.4 Therapie	5
2.2.1.5 Pathomechanismen	6
2.2.2 Hereditäre spastische Paraplegie Typ 31	6
2.2.2.1 Allgemeines	6
2.2.2.2 Klinisches Bild	6
2.2.2.3 Verlauf	7
2.2.2.4 Pathomechanismus	7
2.2.3 Distale hereditäre Motoneuropathien – eine Übersicht	7
2.2.4 Distale hereditäre Motoneuropathie Typ V	8
2.3 Das Spleißen: von der prä-mRNA zur mRNA	8
2.3.1 Von der DNA zum Protein – eine kurze Übersicht	8
2.3.2 Das Spleißen von prä-mRNA	9
2.4 <i>In-silico</i> -Analysen und Minigen-Systeme zur Untersuchung von Spleißeffekten	10
2.4.1 <i>In-silico</i> -Vorhersageprogramme	10

2.4.2 Minigen-Systeme	11
3. Ziele der Arbeit	12
4. Material und Methoden	13
4.1 Übersicht über relevante Varianten im <i>REEPI</i> -Gen	13
4.1.1 <i>REEPI</i> -Varianten aus der Literatur	13
4.1.2 <i>REEPI</i> -Varianten aus Datenbanken	13
4.2 <i>In-silico</i> -Analysen	13
4.2.1 Human Splicing Finder	14
4.2.2 Fruit Fly Splice Site Prediction	14
4.2.3 ESEfinder	15
4.2.4 RESCUE-ESE Web Server	15
4.3 Material	15
4.3.1 Primer	15
4.3.2 Vektoren	17
4.3.3 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	19
4.3.4 Kits	20
4.3.5 Verbrauchsmaterialien und Geräte	21
4.3.6 Stammlösungen, Puffer, Gele und Nährlösungen	21
4.4 Methoden	23
4.4.1 Schematische Darstellung der Abläufe	23
4.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
4.4.2.1 Zielgerichtete Mutagenese mittels primärer und sekundärer PCR	23
4.4.2.2 Kolonie-PCR	25
4.4.2.3 cDNA-PCR	26
4.4.3 Gelelektrophorese	27
4.4.3.1 Agarose-Gelelektrophorese	27
4.4.3.2 Gelextraktion	27
4.4.4 Molekulares Klonieren	28

4.4.4.1 TOPO-TA Klonierung.....	28
4.4.4.2 Transformation kompetenter Bakterien	28
4.4.3.3 Anzucht der selektierten Bakterienkolonien	29
4.4.4.4 Plasmidisolierung	29
4.4.4.5 DNA-Sequenzierung	29
4.4.4.6 Restriktionsverdau.....	30
4.4.4.7 Aufreinigung der Produkte des Restriktionsverdaus.....	31
4.4.4.8 DNA-Ligation	31
4.4.5 Transfektion von <i>HeLa</i> -Zellen	32
4.4.5.1 Aussaat der Zellen.....	32
4.4.5.2 Zellzählung.....	32
4.4.5.3 Transfektion von HeLa-Zellen	33
4.4.6 Ernten der <i>HeLa</i> -Zellen und RNA-Isolierung.....	33
4.4.7 cDNA-Synthese.....	33
5. Ergebnisse	35
5.1 Relevante <i>REEPI</i> -Varianten nach Literaturrecherche	35
5.2 Relevante <i>REEPI</i> -Varianten nach Datenbankrecherche.....	35
5.3 Mögliche Spleißeffekte der <i>REEPI</i> -Varianten nach <i>in-silico</i> -Analysen	36
5.3.1 Vorhersage möglicher Spleißstellen durch den Human Splicing Finder	36
5.3.2 Vorhersage möglicher Spleißstellen durch den Fruit Fly Splice Site Predictor.....	39
5.3.3 Analyse exonischer Spleißverstärker mittels ESEfinder.....	40
5.3.4 Analyse exonischer Spleißverstärker mittels RESCUE-ESE Web Server.....	42
5.3.5 Vergleich der <i>in-silico</i> -Analysen	43
5.4 Klonierung der <i>REEPI</i> -Varianten in den pSPL3-Vektor.....	45
5.4.1 Primäre und sekundäre PCRs zur zielgerichteten Mutagenese	45
5.4.2 Kolonie-PCR nach TOPO-TA Klonierung und Transformation von <i>E.coli</i>	46
5.4.3 DNA-Sequenzierung von erfolgreich klonierten TOPO-Vektoren.....	47
5.4.4 Restriktionsverdau zur Umklonierung der Inserts in den pSPL3-Vektor	48

5.4.5 Kolonie-PCR nach Klonierung in pSPL3-Vektor und Transformation von <i>E.coli</i> .	49
5.4.6 DNA-Sequenzierung von erfolgreich klonierten pSPL3-Vektoren	49
5.5 Auswirkungen der <i>REEP1</i> -Varianten auf das Spleißen der prä-mRNA.....	50
6. Diskussion	54
6.1 <i>In-silico</i> -Analysen zur Vorhersage von möglichen Spleißeffekten	54
6.1.1 Vorhersage von potentiellen Spleißstellen	54
6.1.2 Vorhersage von potentiellen exonischen Spleißverstärkern	55
6.1.3 Einsatz von <i>in-silico</i> -Analysen – ein Fazit.....	56
6.2 Minigen-Systeme zur Untersuchung von Spleißeffekten.....	57
6.3 Einordnung der Ergebnisse vor dem Hintergrund der klinischen Daten	58
6.3.1 Varianten aus den Datenbanken	58
6.3.2 Variante c.304-2A>G	58
6.3.3 Variante c.320T>C und c.340_347delAGTTACGA	59
6.3.4 Variante c.337C>T	59
6.3.5 Variante c.345C>A.....	60
6.3.6 Variante c.366G>T.....	60
6.3.7 Variante c.417+1G>T.....	61
6.4 Korrelieren Veränderungen im prä-mRNA-Spleißen mit einem speziellen Phänotyp?	62
7. Schlussfolgerungen	64
8. Literatur- und Quellenverzeichnis.....	66
9. Anhang	69
I Abbildungsverzeichnis.....	69
II Tabellenverzeichnis	70
III Danksagung	71
IV Ehrenwörtliche Erklärung	72

Abkürzungsverzeichnis

SI-Einheiten

°C	Grad Celsius
∞	unendlich
%	Prozent
bp	Basenpaar
cm	Zentimeter
g	Gramm
kb	Kilo-Basenpaar
M	Molarität
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
pH	pH-Wert
pmol	Picomol
rpm	rotations per minute, Umdrehungen pro Minute
T _m	Schmelztemperatur
U	international unit, internationale Einheit
V	Volt

eigene Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
C	Cytosin
c.	cDNA-Position
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CV	consensus value (Human Splicing Finder), Konsenswert

del	Deletion
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dHMN	distale hereditäre Motoneuropathie
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>EcoRI</i>	“Eco R one”, Restriktionsenzym von <i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylenediaminetetraacetate, Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESE	exonic splice enhancer, exonische Spleißverstärker
ESS	exonic splice silencer, exonischer Spleißdämpfer
EVS	Exome Variant Server
FASTA	textbasiertes Format zur Darstellung von Nukleinsäureprimärstrukturen
G	Guanin
H ₂ O	Wasser
<i>HeLa</i> -Zellen	humane Epithelzellen des Zervixkarzinoms der <u>Henrietta Lacks</u>
HSF	Human Splicing Finder
HSP	hereditäre spastische Paraplegie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ISE	intronic splice enhancer, intronischer Spleißverstärker
ISS	intronic splice silencer, intronischer Spleißdämpfer
<i>lacZ</i>	Gen, das für das Enzym β-Galaktosidase
MKS	multiple Klonierungsstelle
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
Opti-MEM	serumfreies Medium
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
prä-mRNA	precursor messenger RNA, Vorläufer-mRNA
Primer_f	forward primer, Vörwärtsprimer
Primer_r	reverse primer, Rückwärtsprimer
<i>PstI</i>	“Pst one”, Restriktionsenzym von <i>Providencia stuarti</i>
<i>REEP1</i>	Receptor expression-enhancing protein 1
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure

rs ID	reference SNP identity, Referenznummer in der Datenbank
RT-PCR	reverse transcriptase-PCR, reverse Transkriptase PCR
s.	siehe
S.	Seite
SNP	single nucleotide polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismus
snRNA	small nuclear ribonucleic acid, kleine nukleäre Ribonukleinsäuren
SOC	„super optimal broth with catabolite repression“, nährstoffhaltiges Medium zur Transformation
SPG 31	spastische Paraplegie Typ 31
SR-Protein	Serin-/Arginin-reiche Proteine
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
WT	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid

1. Zusammenfassung

Das *REEPI*-Gen (receptor expression-enhancing protein 1) liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 (2p11.2) und kodiert für ein integrales Membranprotein mit Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum. Bezüglich der Expression von *REEPI* in Geweben gibt es kontroverse Ergebnisse. Die neuronenspezifische Expression ist auch vor dem Hintergrund der mit *REEPI* assoziierten Erkrankungen am wahrscheinlichsten. *REEPI*-Mutationen stehen im Zusammenhang mit den neurodegenerativen Erkrankungen hereditäre spastische Paraplegie (HSP) Typ 31 und distale hereditäre Motoneuropathie (dHMN) Typ V. Die HSPs sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen. Bei der reinen Form steht die progrediente Spastik der unteren Extremitäten, die mit einer Gangstörung einhergeht, im Vordergrund. Begleitend können Muskelschwäche und -atrophie oder auch Blasenfunktionsstörungen auftreten. Die komplizierten HSP-Formen sind darüber hinaus durch zusätzliche neurologische und nicht-neurologische Symptome gekennzeichnet. Die HSP Typ 31 wird autosomal-dominant vererbt und durch verschiedene Mutationen verursacht. Bei dem Großteil der Erkrankungsfälle liegt eine reine Form vor. Der individuelle Verlauf und die Ausprägung der Erkrankung sind sehr variabel. Die dHMNs gehen mit einer Schädigung des unteren Motoneurons einher, die zu Atrophie und Schwäche der distalen Muskulatur führt. Bei der dHMN Typ V handelt es sich um eine autosomal-dominant vererbte Form mit Beginn an den Händen. Es ist bislang nur eine einzige Mutation im *REEPI*-Gen beschrieben, die mit diesem Krankheitsbild einhergeht. Es handelt sich dabei um die Variante c.304-2A>G im Spleiß-Akzeptor des Introns 4, die zu einem vollständigen Verlust von Exon 5 führt.

Ziel dieser Dissertation war die Untersuchung weiterer Mutationen im Exon 5 oder den dazugehörigen Spleißstellen der benachbarten Introns 4 und 5, die mit Veränderungen im prä-mRNA-Spleißen und damit einem Verlust des Exons 5 einhergehen könnten. Da einige Patienten mit HSP auch phänotypische Merkmale der dHMN Typ 5 (v.a. eine Atrophie der Handmuskulatur) zeigen, sollten außerdem mögliche Zusammenhänge von prä-mRNA-Spleißen und Phänotyp untersucht werden. Zusätzlich erfolgte eine *in-silico*-Analyse aller Varianten hinsichtlich potentieller Spleißstellen und exonischer Spleißverstärker.

Für die *in-silico*-Analysen wurden jeweils zwei verschiedene Programme verwendet, um die Ergebnisse vergleichen und besser einordnen zu können. Die experimentellen Untersuchungen erfolgten mithilfe eines Minigen-Systems, da *REEPI* nicht im peripheren Blut exprimiert wird. Zu den wichtigsten Arbeitsschritten gehören die zielgerichtete Mutagenese und die Klonierung der daraus resultierenden DNA-Fragmente zunächst in den

TOPO- und schließlich in den pSPL3-Vektor. Letzterer stellt ein solches Minigen-System dar und besitzt zwei eigene Exons sowie ein dazwischen liegendes Intron mit einer Klonierungsstelle. Über dieses ist eine Aufnahme des zu untersuchenden DNA-Fragmentes, das aus Exon 5 sowie Teilen der benachbarten Introns 4+5 besteht, möglich. Nach erfolgreicher Klonierung erfolgte die Transfektion von *HeLa*-Zellen, die in der Lage sind prä-mRNA zu Spleißen. Die mRNA wurde aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und diese mittels PCR amplifiziert. Nach der abschließenden Gelelektrophorese konnte somit eine Beurteilung der einzelnen *REEPI*-Mutationen hinsichtlich ihrer Effekte auf das Spleißen von prä-mRNA erfolgen.

Von den insgesamt 14 untersuchten Varianten aus Patienten und Datenbanken konnten neben der bekannten Spleiß-Mutation c.304-2A>G im Spleißakzeptor des Introns 4 für drei weitere Varianten eine Auswirkung auf das Spleißen von prä-mRNA gezeigt werden. Zwei dieser Varianten (c.345C>A und c.366G>T) zeigten sowohl ein unauffälliges Spleißprodukt als auch den (partiellen) Verlust des Exons 5 in der mRNA. Die dritte Variante (c.417+1G>T) geht mit einem vollständigen Verlust von Exon 5 einher. Die *in-silico*-Analysen hatten diese Ergebnisse zuvor teilweise prognostizieren können. Vor allem die Programme zur Analyse potentieller Spleißstellen zeigten übereinstimmende Ergebnisse. Die Analysen der exonischen Spleißverstärker waren weniger eindeutig.

Unter Berücksichtigung der experimentellen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass vor allem die bioinformatischen Programme zur Vorhersage der Spleißstellen eine gute Ergänzung darstellen. Generell sollten *in-silico*-Analysen allerdings nicht als einzige Methode zur Untersuchung von Spleißeffekten eingesetzt werden. Minigen-Systeme sind gut geeignete Alternativen, wenn die Untersuchung von Patienten-mRNA nicht möglich ist. Es muss allerdings beachtet werden, dass es Abweichungen zu der tatsächlichen mRNA-Expression in den betroffenen Geweben geben kann und das Zusammenspiel aller am Spleißen beteiligten Komponenten im Organismus nicht gleichwertig zu ersetzen ist. Die Frage nach der Korrelation von prä-mRNA-Spleißen und Auftreten phänotypischer Merkmale der distalen hereditären Motoneuropathie Typ V kann allein aufgrund der Ergebnisse dieser Dissertation nicht beantwortet werden.

Bezüglich der mit *REEPI*-Mutationen einhergehenden Erkrankungen sowie zur Klärung der zugrunde liegenden Pathomechanismen sind in vielerlei Hinsicht weitere Forschungen nötig. Mit Vorliegen einer größeren Anzahl von Mutationen bzw. der klinischen Untersuchung weiterer Träger von schon bekannten Veränderungen können neue Erkenntnisse gewonnen und Zusammenhänge besser verstanden werden.

2. Einleitung

2.1 Das *REEPI*-Gen

2.1.1 Allgemeines

Das *REEPI*-Gen (receptor expression-enhancing protein 1, MIM 609139) befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 (2p11.2). Es besteht aus insgesamt sieben Exons, kodiert für ein Protein mit 201 Aminosäuren und besitzt als integrales Membranprotein zwei hydrophobe Transmembrandomänen (Saito et al. 2004, Zuchner et al. 2006, Park et al. 2010). Das für *REEPI* codierende Gen gehört zu einer Genfamilie mit zwei Subtypen in Vertebraten (*REEPI-4* und *REEPI-5-6*) und es besteht eine Verwandtschaft dieser Genfamilie zum *Yoplp* der Hefe (Park et al. 2010).

2.1.2 Vorkommen in der Zelle

Bezüglich des Vorkommens in den Zellkompartimenten existieren kontroverse Ergebnisse. Das Protein ist im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und ragt mit seinem C-terminalen Ende ins Zytoplasma. Es wird davon ausgegangen, dass auf diese Weise die Interaktion mit den Mikrotubuli stattfindet und *REEPI* somit zu einem Umbau des ER beitragen kann (Park et al. 2010, Blackstone et al. 2011). Laut Zuchner et al. 2006 konnte das Vorkommen von *REEPI* immunhistochemisch in Mitochondrien, nicht aber in Mikrotubuli oder dem Golgi-Apparat nachgewiesen werden. Beetz et al. 2013 bestätigten mittels Western Blot das Vorkommen im ER, der Nachweis in den Mitochondrien gelang dagegen nicht.

2.1.3 Expression von *REEPI* in Geweben

Auch hinsichtlich der Expression von *REEPI* in den verschiedenen Geweben gibt es, je nach Untersuchungsmethode, Unterschiede. Zunächst konnte *REEPI* durch Northern Blot im olfaktorischen Epithel, dem Vomeronasalorgan sowie dem Gehirn nachgewiesen werden (Saito et al. 2004). Im Rahmen dieser Studie konnte auch gezeigt werden, dass *REEPI* die Expression von G-Protein-gekoppelten Geruchsrezeptorproteinen auf der Zelloberfläche begünstigt. Mittels reverser Transkriptase PCR (RT-PCR) wurde *REEPI*-mRNA in einer anderen Veröffentlichung ubiquitär in den unterschiedlichsten Geweben (z.B. Lunge, Leber, Niere, Gehirn, Muskeln), allerdings nicht im peripheren Blut oder in Fibroblasten, nachgewiesen (Zuchner et al. 2006). Weitere Untersuchungen deuten dagegen auf eine neuronenspezifische Expression hin. Es konnte gezeigt werden, dass *REEPI* in den

Motoneuronen des Rückenmarks (Beetz et al. 2012) sowie in kortikalen Neuronen exprimiert wird (Beetz et al. 2013). Auch eine Immunoblot-Analyse an verschiedenen Geweben von Mäusen bestätigte dies (Hurt et al. 2014). Hier wurde die Expression von *REEP1* in Gehirn, Rückenmark und sympathischen Ganglien, nicht aber in Muskeln, Herz, Lunge oder Leber nachgewiesen. Außerdem zeigte sich eine Expression im Hodengewebe. Da zwischen neuronalem Gewebe und Hodengewebe große Ähnlichkeit bezüglich der Genexpressionsmuster besteht, ist diese Lokalisierung allerdings nicht ungewöhnlich. (Guo et al. 2003).

Hurt et al. 2014 führen die Unterschiede in den Expressionsmustern auf die verwendeten Untersuchungsmethoden zurück. Wird *REEP1*-mRNA in Geweben stark exprimiert, lässt sich dies auch durch einen Immunoblot nachweisen. Erfolgt dagegen nur eine geringe mRNA-Expression, so kann das entsprechende Protein nicht durch einen Immunoblot nachgewiesen werden. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass auf die Expression eines Proteins nicht allein aufgrund der Expression von mRNA in einem Gewebe geschlossen werden kann.

2.2 Mit *REEP1* assoziierte Krankheitsbilder

Bislang ist eine Assoziation von *REEP1* mit zwei Krankheitsbildern beschrieben: hereditäre spastische Paraplegie (HSP) und distale hereditäre Motoneuropathie (dHMN). Der Zusammenhang mit diesen beiden neurologischen Erkrankungen unterstützt die Ergebnisse, dass *REEP1* neuronenspezifisch exprimiert wird (Hurt et al. 2014).

2.2.1 Hereditäre spastische Paraplegien – eine Übersicht

2.2.1.1 Epidemiologie

Die HSPs sind eine heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen. Sie gehören mit einer Prävalenz von ca. 2-10/100000 zu den seltenen Erkrankungen (Braschinsky et al. 2009, Erichsen et al. 2009).

2.2.1.2 Klinisches Bild

Man unterscheidet in der Einteilung die reine oder unkomplizierte HSP von der komplizierten oder komplexen HSP. Bei den reinen HSP-Formen steht die Schädigung des Tractus corticospinalis im Vordergrund: das Leitsymptom ist eine progrediente Spastik der unteren Extremitäten. Bei den Betroffenen zeigen sich zudem häufig eine Muskelschwäche und eine Hyperreflexie. Unter Beteiligung der Hinterstrangbahnen kommt es auch zu einem

reduzierten Vibrationsempfinden und einer gestörten Tiefensensibilität der Beine. Neben der Gangstörung, die bis zur Rollstuhlpflicht führen kann, kann es bei Patienten mit reiner HSP aber auch zu Blasenfunktionsstörungen (Harninkontinenz oder imperativer Harndrang) kommen. Kraft und Funktionalität der oberen Extremitäten sowie Sprechen, Kauen oder Schlucken sind bei einer reinen HSP nicht beeinträchtigt. Der Verlauf ist individuell sehr unterschiedlich und die genannten Symptome können bei den Betroffenen mehr oder weniger stark ausgeprägt sein. In der Regel schreitet die Krankheit über viele Jahre oder Jahrzehnte voran ohne die Lebenserwartung zu verkürzen. Die komplizierten HSP-Formen sind darüber hinaus durch weitere Manifestationen gekennzeichnet, die gegebenenfalls zu Komplikationen und damit einhergehend zu einer Verkürzung der Lebenserwartung führen können. Zu möglichen neurologischen Symptomen gehören u.a. kognitive Einschränkungen, Demenz, epileptische Anfälle, Aphasie, extrapyramidale Störungen (z.B. Dyskinesie), zerebelläre Schädigungen (z.B. Ataxie oder Dysarthrie) oder das Auftreten eines Hydrozephalus. Zu den nicht-neurologischen Symptomen zählen Retinopathie, Optikusatrophie, Taubheit, Verlust des Sehvermögens oder faciale Dysmorphien. (Harding 1983, Goizet et al. 2011, Schule und Schols 2011, Finsterer et al. 2012, Fink 2013)

2.2.1.3 Genetik

Auch genetisch sind die HSPs eine sehr heterogene Gruppe. Sie folgen überwiegend einem autosomal-dominanten oder autosomal-rezessiven Erbgang. Eine x-chromosomale oder mitochondriale Vererbung sind hingegen selten. Bislang wurde eine Vielzahl an Genen als Ursache für die verschiedenen HSP-Typen, die entsprechend der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert werden, gefunden. Zwischen den einzelnen HSP-Typen, aber auch innerhalb einer Familie mit derselben Mutation, gibt es große Unterschiede bezüglich des Erkrankungsalters, der individuellen Ausprägung, des Verlaufs und der Schwere. Da aufgrund des Phänotyps und der klinischen Befunde eine eindeutige Zuordnung oft nicht möglich ist, sollte eine molekulargenetische Testung zur sicheren Diagnosestellung erfolgen. (Depienne et al. 2007, Schule und Schols 2011, Schlipf et al. 2011, Goizet et al. 2011, Verny et al. 2011, Finsterer et al. 2012)

2.2.1.4 Therapie

Eine kausale Behandlung der HSP ist bislang nicht möglich. Je nach Schweregrad und vorherrschenden Symptomen sollte eine gezielte Therapie zur Verbesserung der Funktionalität und der Lebensqualität der betroffenen Patienten erfolgen. Dazu gehören neben

der medikamentösen Behandlung von Spastik, Muskelschwäche oder Blasenfunktionsstörung vor allem umfangreiche physiotherapeutische Maßnahmen oder die Versorgung mit Orthesen. (Fink 2013)

2.2.1.5 Pathomechanismen

Da viele HSP-Typen sowohl mit einer reinen als auch einer komplizierten HSP einhergehen können, spielen möglicherweise andere modifizierende Faktoren, z.B. weitere Gene oder Umwelteinflüsse, eine Rolle. Auch die Heterogenität und die Vielzahl der an den HSPs beteiligten Proteine bekräftigen die Vermutung, dass die Axone des Tractus corticospinalis durch verschiedenste Einwirkungen beeinflusst werden können. Offensichtlich sind die unterschiedlichen HSPs nicht auf einen gemeinsamen Pathomechanismus zurückzuführen. (Fink 2013)

2.2.2 Hereditäre spastische Paraplegie Typ 31

2.2.2.1 Allgemeines

Die HSP Typ 31 (MIM 610250), auch als spastische Paraplegie Typ 31 (SPG31) bezeichnet, gehört mit ca. 2,3%-6,5% neben der SPG4 und SPG3A zu den drei häufigsten autosomal-dominant vererbten HSPs. Hervorgerufen wird die SPG31 durch Mutationen im *REEPI*-Gen. Es sind verschiedene Arten von Mutationen beschrieben worden: vor allem kleinere Insertionen und Deletionen (Leseraster- oder Frameshift-Mutationen), Nonsense- und Missense-Mutationen sowie Spleiß-Mutationen. Ebenso konnten mehrere Exons umfassende Deletionen oder Duplikationen nachgewiesen werden, auch wenn Kopienzahlveränderungen im *REEPI*-Gen insgesamt selten sind. Es wird angenommen, dass Haploinsuffizienz der zugrundeliegende Mechanismus für die SPG31 ist. Von Haploinsuffizienz spricht man, wenn das Vorliegen nur einer intakten Genkopie nicht für die normale Funktion des Proteins ausreichend ist. (Zuchner et al. 2006, Beetz et al. 2008, Schlang et al. 2008, Hewamadduma et al. 2009, Battini et al. 2011, Goizet et al. 2011)

2.2.2.2 Klinisches Bild

Mutationen im *REEPI*-Gen gehen überwiegend mit reiner HSP einher, es sind aber auch Fälle von komplizierter HSP bekannt. Mögliche zusätzliche Symptome können Atrophie der Handmuskulatur, periphere Neuropathie, Tremor und kognitive Beeinträchtigungen sein. (Zuchner et al. 2006, Beetz et al. 2008, Goizet et al. 2011)

2.2.2.3 Verlauf

Der Erkrankungsbeginn liegt in der Mehrzahl der Fälle vor dem 20. Lebensjahr. Nur etwa ein Drittel der Patienten erkrankt nach dem 30. Lebensjahr oder im höheren Lebensalter. Auch innerhalb einer Familie ist der Zeitpunkt des Auftretens erster Symptome sehr unterschiedlich. Die SPG31 gehört somit zu den frühmanifesten HSP-Typen. Vor allem bei Kindern kann die Diagnosestellung schwierig sein. Neben Familienanamnese und neurologischer Untersuchung sollte auch immer eine Bildgebung zum Ausschluss von strukturellen Läsionen oder Schädigungen der weißen Substanz veranlasst werden, da eine Vielzahl von Differenzialdiagnosen (z.B. Zerebralparese oder Leukodystrophie) beachtet werden muss. (Beetz et al. 2008, de Bot et al. 2010, Goizet et al. 2011)

2.2.2.4 Pathomechanismus

Es wird angenommen, dass *REEPI* über seine hydrophoben Transmembrandomänen mit den Proteinen Atlastin-1 und Spastin interagiert und es somit zu einer Regulation der Strukturen des ER sowie zu Interaktionen mit dem Zytoskelett in Neuronen kommt (Park et al. 2010, Blackstone et al. 2011). Laut Park et al. 2010 ist in diesem Zusammenhang der Pathomechanismus der durch *REEPI* bedingten HSP zu sehen.

2.2.3 Distale hereditäre Motoneuropathien – eine Übersicht

Ebenso wie die HSPs stellen die dHMNs eine heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen dar, die auch als distale spinale Muskelatrophie oder als spinale Charcot-Marie-Tooth bezeichnet werden. Bei den dHMNs kommt es zu einer Schädigung der unteren Motoneurone, die zu Schwäche und Atrophie der distalen Muskulatur führt. Die Muskelschädigung kann an den unteren und/oder oberen Extremitäten auftreten und es sind weitere Symptome wie Fußdeformitäten (Pes cavus), Pyramidenbahnzeichen oder sensorische Schädigungen möglich. Ursprünglich umfasste die Einteilung der dHMNs sieben Typen, die autosomal-dominant oder autosomal-rezessiv vererbt werden und in Ausprägung, Verlauf und Erkrankungsbeginn variieren. Mittlerweile wird u.a. auch eine x-chromosomal vererbte Form beschrieben. Den unterschiedlichen dHMNs liegen Veränderungen in verschiedenen Genen zugrunde. Allerdings nimmt man an, dass bis zu 80% der Patienten mit dHMN Veränderungen in bislang nicht entdeckten Genen tragen. (Kuhlenbäumer et al. 2005, Rossor et al. 2012, Beetz et al. 2012, Landrieu et al. 2013)

2.2.4 Distale hereditäre Motoneuropathie Typ V

Die dHMN V (MIM 614751) gehört zu den autosomal-dominant vererbten Formen der dHMN und die Patienten erkranken meist bis zum 20. Lebensjahr. Bei dieser Form ist typischerweise die Muskulatur der oberen Extremität, v.a. der Hände, betroffen. Die dHMN V geht unter anderem mit Mutationen in den Genen *GARS* (glycyl-tRNA Synthetase) und *BSCL2* (Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy type 2) einher. Für beide Gene gibt es weitere Krankheitsbilder, mit denen sie assoziiert sind. Bei Auftreten einer *GARS*-Mutation in Verbindung mit sensorischen Ausfällen spricht man von Charcot-Marie-Tooth Typ 2D. Auch für Mutationen im *BSCL2*-Gen gibt es unterschiedliche phänotypische Ausprägungen. Diese reichen von einer reinen dHMN V bis zum sogenannten Silver-Syndrom. Letzteres gehört zu den komplizierten HSPs (SPG17) und geht mit einer Spastik der Beine sowie Atrophie der Handmuskulatur einher. Auch im Bereich der unteren Extremitäten sind Atrophien möglich. Darüber hinaus konnten *BSCL2*-Mutationen auch in Patienten mit einer autosomal-rezessiven Lipodystrophie gefunden werden. (Irobi et al. 2004, Kühlenbäumer et al. 2005, Rossor et al. 2012)

Im Jahr 2012 konnte in einer Familie mit dHMN V eine Mutation im *REEPI*-Gen nachgewiesen werden. Bis dahin waren *REEPI*-Mutationen lediglich in Patienten mit HSP Typ 31 (s. Abschnitt 2.2.2, S. 6) beschrieben worden. Die in den Patienten mit dHMN V gefundene Mutation liegt im Spleißakzeptor von Intron 4 des *REEPI*-Gens und geht mit einem Verlust des kompletten Exons 5 einher. Es kommt dadurch zur Expression einer mutierten mRNA. Die Autoren gehen davon aus, dass die Entstehung der dHMN V auf einen anderen Pathomechanismus als die HSP zurückzuführen ist. (Beetz et al. 2012)

2.3 Das Spleißen: von der prä-mRNA zur mRNA

2.3.1 Von der DNA zum Protein – eine kurze Übersicht

Die Synthese von Proteinen aus den Informationen der DNA ist ein mehrstufiger Prozess. Zunächst erfolgt während der Transkription das Umschreiben von doppelsträngiger DNA in einzelsträngige RNA. Aus der Information der RNA wird in der Translation schließlich die Aminosäuresequenz abgelesen und das Protein synthetisiert. Zwischen Transkription und Translation findet die RNA-Prozessierung statt, bei der prä-mRNA zu mRNA modifiziert wird. Teil dieser RNA-Prozessierung ist auch das sogenannte Spleißen, auf das im Folgenden näher eingegangen werden soll, um die für diese Dissertation relevanten Mechanismen kurz

zu erläutern. Darüber hinaus sind die detaillierten Abläufe der Proteinbiosynthese nicht Gegenstand dieser Dissertation.

2.3.2 Das Spleißen von prä-mRNA

In den 1970er Jahren fanden Forscher heraus, dass in Eukaryonten die codierenden Sequenzen der RNA durch lange, nichtcodierende Bereiche unterbrochen werden. Im Verlauf wurden die codierenden Bereiche als Exons und die nichtcodierenden Bereiche als Introns bezeichnet. Es zeigte sich, dass nur die codierenden Bereiche für die Proteinsynthese relevant sind. Der Prozess, der das Ausschneiden der Introns und das anschließende Verknüpfen der Exons umfasst, erhielt den Namen Spleißen. (Chow et al. 1977, Jeffreys und Flavell 1977, Gilbert 1978)

Das Spleißen wird von den sogenannten Spleißosomen katalysiert. Diese Komplexe bestehen u.a. aus verschiedensten kleinen nukleären Ribonukleinsäuren (snRNAs), die sich mit Proteinen zusammenlagern, und einer Vielzahl weiterer Spleißfaktoren. (Will und Luhrmann 2011, Burge et al. 1998, Jurica und Moore 2003)

Man fand heraus, dass sogenannte Konsensus-Sequenzen existieren, anhand derer Introns und Exons erkannt werden und die somit zum korrekten Spleißen der prä-mRNA beitragen. Die Spleißstelle am 5'-Ende des Introns (Spleißdonorstelle) ist durch ein Dinukleotid, bestehend aus den Basen GU (RNA) bzw. GT (DNA), gekennzeichnet. Die Spleißakzeptorstelle befindet sich am 3'-Ende des Introns. Neben dem aus den Basen AG bestehenden Dinukleotid gehören zu dieser Spleißstelle auch der sogenannte Branch Point (Verzweigungsstelle, meist ein Adenin) und der Polypyrimidin-Trakt, der zum großen Teil Pyrimidinbasen enthält. Diese Sequenzen sind gemeinsam mit dem Spleißosom von zentraler Bedeutung beim korrekten Herausspleißen der Introns. (Baralle und Baralle 2005, Will und Luhrmann 2011)

Es wurden darüber hinaus aber noch weitere Elemente gefunden, die einen Einfluss auf das Spleißen haben bzw. auch zum sogenannten alternativen Spleißen beitragen können. Durch alternatives Spleißen können aus einer prä-mRNA verschiedene mRNAs erzeugt werden, die sich in der Zusammensetzung der Exons unterscheiden. Alternatives Spleißen trägt damit maßgeblich zur spezifischen Genexpression in unterschiedlichen Geweben bei. Die Elemente können sowohl in intronischen als auch extronischen Bereichen liegen und werden entsprechend ihrer Eigenschaft im Bezug auf das Erkennen von Spleißstellen als Enhancer (Verstärker) oder Silencer (Dämpfer) bezeichnet: man unterscheidet ESE (exonic splice enhancer), ESS (exonic splice silencer), ISE (intronic splice enhancer) und ISS (intronic splice silencer). Vor allem zu den ESEs gibt es viele Studien und es ist bekannt, dass der

Großteil durch Serin-/Arginin-reiche Proteine (SR-Proteine) erkannt wird. (Maniatis und Tasic 2002, Baralle und Baralle 2005, Long und Caceres 2009, Baralle und Baralle 2018)

Abbildung 1 zeigt schematisch für das Spleißen relevante Komponenten der prä-mRNA. Das Zusammenspiel all dieser Komponenten ist ein sehr komplexer Vorgang.

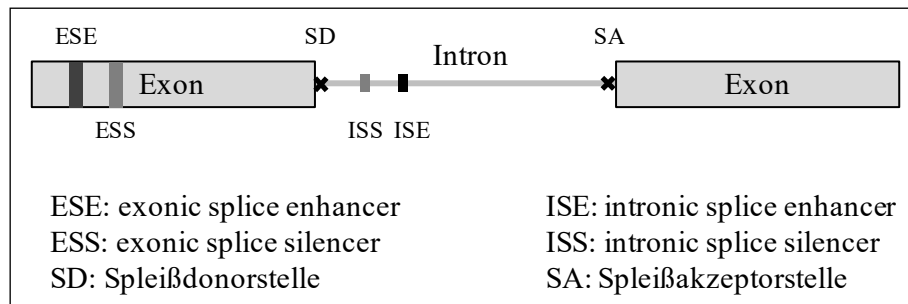


Abbildung 1 Übersicht, der für das Spleißen relevanten Komponenten der prä-mRNA

2.4 *In-silico*-Analysen und Minigen-Systeme zur Untersuchung von Spleißeffekten

Mutationen in Introns oder Exons können auf unterschiedliche Art und Weise Einfluss auf das korrekte Spleißen und damit die Prozessierung der mRNA haben. Nicht nur Mutationen, welche die Spleißakzeptor- oder Spleißdonorstelle direkt betreffen, gehen mit Spleißdefekten einher. Auch Missense-, Nonsense- oder Leserastermutationen sowie stille Mutationen können das korrekte Spleißen beeinflussen, wenn sie beispielsweise die Sequenz wichtiger Elemente (ESE, ESS, ISE, ISS) oder die Sekundärstruktur der mRNA verändern. Zudem ist es auch möglich, dass aufgrund von Mutationen Exons herausgeschnitten oder neue Spleißstellen generiert werden. Es wird angenommen, dass Mutationen als krankheitsverursachend übersehen werden können, wenn sie nur mithilfe einer DNA-Sequenzanalyse und der daraus resultierenden Auswirkungen auf die Proteinsequenz charakterisiert werden. Die aussagekräftigste Möglichkeit um die Auswirkungen von Mutationen auf das Spleißen zu untersuchen, ist die Analyse von Patienten-RNA aus dem betroffenen Gewebe. Da dies nicht immer realisierbar ist, stehen alternative Optionen zur Verfügung. Zu diesen gehören u.a. *in-silico*-Vorhersageprogramme oder sogenannte Minigen-Systeme, die im Folgenden kurz erläutert werden sollen. (Baralle und Baralle 2005, Cooper 2005)

2.4.1 *In-silico*-Vorhersageprogramme

Es gibt verschiedenste Vorhersageprogramme mit denen eine erste Orientierung hinsichtlich der Auswirkungen von Mutationen auf das Spleißen möglich ist. Im Idealfall sollten diese

bioinformatischen Anwendungen als Ergänzung zu experimentellen Untersuchungen eingesetzt werden. Es existieren Vorhersageprogramme zur Analyse von Mutationen in Spleißakzeptor- und Spleißdonorstellen, ihren Auswirkungen auf regulierende Elemente (Enhancer und Silencer) oder auf Veränderungen der mRNA-Sekundärstruktur. Die *in-silico*-Analysen ermöglichen Untersuchungen in vielen Abschnitten der DNA, allerdings nicht in tiefintronischen Bereichen. Es findet eine stete Weiterentwicklung der Programme statt und Aussagemöglichkeiten und Genauigkeit können vor allem aufgrund experimenteller Ergebnisse verbessert werden. (Baralle und Baralle 2005)

2.4.2 Minigen-Systeme

Für Minigen-Systeme werden Plasmidvektoren benötigt, zu deren wichtigsten Bestandteilen u.a. zwei vektoreigene Exons sowie ein zwischen diesen befindliches, vektoreigenes Intron mit einer Klonierungsstelle gehören. Über die Klonierungsstelle kann ein DNA-Fragment (Insert) in den Vektor eingebracht werden. Zur Analyse exonischer Mutationen besteht dieses üblicherweise aus einem Exon sowie Teilen der angrenzenden Introns des zu untersuchenden Gens. Abbildung 2 zeigt schematisch die wichtigsten Komponenten eines Minigen-Systems.

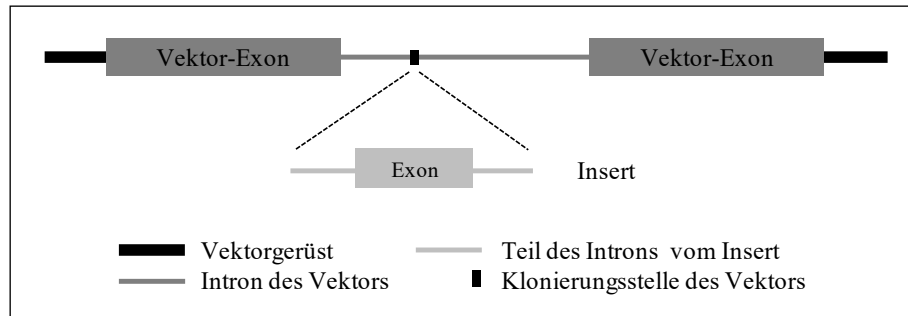


Abbildung 2 Wichtige Komponenten eines Minigen-Systems

Nach Transfektion von eukaryontischen Zellen mit dem klonierten Vektor, kann die von diesen gespleißte mRNA weiter untersucht werden. Nach abschließender PCR und Agarose-Gelelektrophorese ist dann ein Rückschluss auf mögliche Spleißeffekte einer Mutation im Vergleich zum Spleißprodukt des Wildtyps möglich. (Buckler et al. 1991, Cooper 2005, Baralle und Baralle 2005, Gaildrat et al. 2010)

3. Ziele der Arbeit

Schon länger sind Mutationen im *REEPI*-Gen als krankheitsverursachend für HSP Typ 31 bekannt. Im Jahr 2012 konnte allerdings gezeigt werden, dass Mutationen im *REEPI*-Gen auch mit dHMN V einhergehen können (Beetz et al. 2012).

Im Rahmen der Studie von Beetz et al. konnte in einer Familie mit dHMN V eine Mutation im Spleißakzeptor von Intron 4 des *REEPI*-Gens nachgewiesen werden, die zu einer kompletten Deletion des Exons 5 führt. Eine Besonderheit daran ist, dass es bei Verlust des Exons 5 nicht zu einer Verschiebung des Leserasters kommt. Dadurch wird eine mutierte mRNA exprimiert, die mit einer neuen bzw. veränderten Funktion einhergeht - man spricht von einer sogenannten gain-of-function Mutation. Die Autoren gehen davon aus, dass darin der Unterschied zu den in HSP gefundenen Mutationen liegt, die mit einem Funktionsverlust einhergehen und als loss-of-function Mutationen bezeichnet werden. Den Autoren stellt sich zudem die Frage, ob es weitere *REEPI*-Mutationen gibt, die zu ähnlichen Effekten, wie die von ihnen beschriebenen, führen. Ebenso halten sie es für möglich, dass solche Mutationen die Ursache für das gleichzeitige Vorliegen phänotypischer Merkmale von HSP und dHMN sein können.

Im Rahmen dieser Dissertation sollen, aufbauend auf die Ergebnisse von Beetz et al. 2012, Mutationen und Varianten im Exon 5 von *REEPI* sowie in den angrenzenden Spleißakzeptor- und Spleißdonorstellen hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf das Spleißen von prä-mRNA untersucht werden. Wie oben beschrieben, zeigen einige Patienten mit HSP phänotypische Merkmale von dHMN. Es soll daher untersucht werden, ob Veränderungen im Spleißen der prä-mRNA dafür ursächlich sein können. Des Weiteren sollen alle Mutationen ergänzend mit verschiedenen *in-silico*-Vorhersageprogrammen analysiert werden.

Da es bei den mit *REEPI* assoziierten Erkrankungen noch viele offene Fragen gibt, soll mit den Ergebnissen dieser Dissertation ein Beitrag zum besseren Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen geleistet bzw. das Wissen bezüglich des Spektrums dieser Erkrankungen erweitert werden.

4. Material und Methoden

4.1 Übersicht über relevante Varianten im *REEPI*-Gen

4.1.1 *REEPI*-Varianten aus der Literatur

Die Literaturrecherche nach Publikationen, die *REEPI*-Varianten im Genom von Patienten mit HSP beschreiben, erfolgte mithilfe der Datenbank PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>; 23.10.2012). Die Begriffe „*REEPI* + HSP“ wurden kombiniert zur Suche verwendet. Von den insgesamt zehn Suchergebnissen wurden im Rahmen dieser Dissertation nur Publikationen berücksichtigt, die Varianten im Exon 5 des *REEPI*-Gens oder den dazugehörigen Spleißstellen der benachbarten Introns 4 und 5 beinhalteten.

4.1.2 *REEPI*-Varianten aus Datenbanken

Für die Suche nach weiteren Varianten im Exon 5 des *REEPI*-Gens und den dazugehörigen Spleißstellen wurden der Exome Variant Server (EVS, <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>; 12.04.2013) und die Datenbank für Einzelnukleotid-Polymorphismen (dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>; Build 137; 12.04.2013) verwendet.

Im Falle des EVS wurde im Registerreiter „Data Browser“ unter dem Stichwort „*REEPI*“ gesucht. In dem sich öffnenden Browserfenster wurden unter dem Registerreiter „Variant Result“ die Populationen der europäischen Amerikaner und Afroamerikaner eingeschlossen. Weiterhin wurde die Auswahl „Selected Transcript“ auf „NM_022912.2“ geändert. Alle weiteren Einstellungen wurden beibehalten.

Bei der Verwendung von dbSNP wurde in der Datenbank „SNP“ unter den kombinierten Stichworten „*REEPI* AND homo sapiens“ nach Varianten gesucht. In der Ergebnisübersicht erschien hinter dem Gennamen *REEPI* die Option „GeneView“. Nach Öffnung des entsprechenden Links wurden im nachfolgenden Browserfenster die Voreinstellungen beibehalten und die für diese Dissertation relevanten *REEPI*-Varianten aus der Tabelle ausgewählt.

4.2 *In-silico*-Analysen

Mithilfe von Spleiß-Vorhersageprogrammen sollten mögliche Auswirkungen der zu untersuchenden *REEPI*-Varianten auf das Spleißen von prä-mRNA analysiert werden. Von besonderem Interesse waren dabei die Einflüsse der verschiedenen Varianten auf mögliche

Spleißstellen und exonische Spleißverstärker („exonic splice enhancer“, ESE). Sowohl für die Analysen der Spleißstellen als auch der exonischen Spleißverstärker wurden jeweils zwei verschiedene Programme (s. Abschnitte 4.2.1-4.2.4) verwendet.

Zur Detektion möglicher Spleißstellen wurde die in Abbildung 3 in 5'→3'-Richtung dargestellte DNA-Sequenz analysiert. Sie umfasst das komplette Exon 5 (c.304-c.417) sowie die benachbarten 30 bp der Introns 4 und 5. Für die Analyse möglicher Auswirkungen auf die exonischen Spleißverstärker umfasste die DNA-Sequenz das komplette Exon 5 ± 10 bp (keine eigene Abbildung). Bei der hier abgebildeten DNA-Sequenz handelt es sich um die Wildtyp-Sequenz. Die DNA-Sequenzen der untersuchten Varianten sind nicht im Einzelnen aufgeführt.

```
CTCAGTGTGCCTCTGTTTTTCCTTTGACAGGAAATCGATGATTGTCTGGTCCAAGCAAAAGA  
CCGAAGTTACGATGCCCTTGTGCACTTCGGGAAGCGGGGCTTGAACGTGGCCGCCACAGCGG  
CTGTGATGGCTGCTTCCAAGGTACTGTGCTGGAAGTACCACAACACTACATG
```

Abbildung 3 Für *in-silico*-Analysen verwendete DNA-Sequenz (Wildtyp, 5'→3'), grau hinterlegt: Exon 5 des *REEPI*-Gens, weiß hinterlegt: Teile der benachbarten Introns 4+5

4.2.1 Human Splicing Finder

Für die Vorhersage möglicher Spleißstellen wurde unter anderem das Programm Human Splicing Finder 3.0 (HSF, <http://www.umd.be/HSF3/>; 07.10.2014) verwendet (Desmet et al. 2009). Der HSF ermittelt einen Konsenswert („consensus value“, CV) zwischen 0 und 100, welcher anhand eines speziellen Algorithmus berechnet wird. Unterschieden wird zwischen starken Spleißstellen (CV=80-100) und potentiellen Spleißstellen (CV=70-80). Für die Auswertung wurden ausschließlich Spleißstellen mit einem CV>70 berücksichtigt.

Unter dem Registerreiter „Analyze Now“ wurden Analysetyp („Analyze a sequence“) und die Sequenzart („Pasting your own sequence“) ausgewählt. Anschließend wurden die HS Matrizen zum Anzeigen der Spleißstellen ausgewählt. Alle anderen Matrizen wurden nicht berücksichtigt.

4.2.2 Fruit Fly Splice Site Prediction

Als zweites Programm zur Analyse möglicher Spleißstellen wurde Fruit Fly Splice Site Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html; 13.10.2014) genutzt (Reese et al. 1997). Es analysiert mögliche Spleißstellen mithilfe spezieller Erkennungssequenzen.

Spleißdonorstellen sind typischerweise durch die Basen GT und Spleißakzeptorstellen durch die Basen AG charakterisiert.

Die entsprechenden Sequenzen wurden in das Formular übertragen und die Voreinstellungen übernommen. Entsprechend der Stärke der Spleißstelle wird ein Score zwischen 0 und 1 ermittelt und die Sequenz der Spleißstelle angegeben.

Dieses Analyseprogramm wurde auf der Website des Berkeley Drosophila Genome Project veröffentlicht, das sich der Erforschung des Genoms der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) widmet.

4.2.3 ESEfinder

Zur Analyse möglicher exonischer Spleißverstärker wurde unter anderem das Programm ESEfinder (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese finder.cgi>; 13.10.2014) verwendet. Der ESEfinder (Cartegni et al. 2003, Smith et al. 2006) analysiert exonische Sequenzen, um ESEs zu finden, die von speziellen Serin-/Arginin-reichen Proteinen (SR-Proteinen) gebunden werden können. Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle für das korrekte Spleißen von prä-mRNA. Der ESEfinder berücksichtigt die nachfolgenden SR-Proteine: SRSF1, SRSF1(IgM-BRCA1), SRSF2, SRSF5 und SRSF6.

Die zu untersuchende Sequenz wurde im FASTA Format in das Suchfeld eingegeben und die Voreinstellungen nicht verändert.

4.2.4 RESCUE-ESE Web Server

Mögliche exonische Spleißverstärker wurden zusätzlich mit dem RESCUE-ESE Web Server (<http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>; 25.09.2014) untersucht. Der RESCUE-ESE Web Server (Fairbrother et al. 2002) identifiziert spezielle Hexanukleotidsequenzen als mögliche exonische Spleißverstärker.

Die zu untersuchende Sequenz wurde in das entsprechende Formular übertragen und humane ESEs ausgewählt.

4.3 Material

4.3.1 Primer

Alle verwendeten Primer wurden durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) hergestellt.

4. Material und Methoden

Aus den gelieferten lipophilisierten Primern wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 100 pmol/μl angefertigt, die Arbeitslösungen hatten eine Konzentration von 10 pmol/μl. Primer, die für die zielgerichtete Mutagenese verwendet wurden, sind mit Sequenz, Länge und Schmelztemperatur in Tabelle 1 aufgeführt. Eine Übersicht über die weiteren eingesetzten Primer zeigt Tabelle 2.

Tabelle 1 Primer zur zielgerichteten Mutagenese mit Sequenz, Länge und Schmelztemperatur

Name des Primers	Sequenz (5'→3')	Länge [bp]	T _m [°C]*
304-2A>G_f	CTCTGTTTTTTCCTTTGAC G GGAAATCGATGATTGTC	36	68,3
304-2A>G_r	GACAATCATCGATTTC C GTCAAAGGAAAAACAGAG	36	68,3
320T>C_f	GGAAATCGATGATTGT C GGTCCAAGCAAAAGAC	34	69,5
320T>C_r	GTCTTTTGCTTGGAC C GACAATCATCGATTTC	34	69,5
337C>T_f	GGTCCAAGCAAAAGAC T GAAGTTACGATGCCC	32	69,5
337C>T_r	GGGCATCGTAACTT C AGTCTTTTGCTTGGACC	32	69,5
340_347del_f	CTGGTCCAAGCAAAAGACCGATG C CCCTTGTGCACTTCGGG	40	>75
340_347del_r	CCCGAAGTGCACAAGGGC A TGGTCTTTTGCTTGGACCAG	40	>75
345C>A_f	CAAAAGACCGAAGTTA A GATGCCCTTGTGCACTTC	35	69,5
345C>A_r	GAAGTGCACAAGGGCAT C TTAACTTCGGTCTTTTG	35	69,5
345C>T_f	GCAAAAGACCGAAGTTA T GATGCCCTTGTGCACTTC	36	70,6
345C>T_r	GAAGTGCACAAGGGCAT A TAACTTCGGTCTTTTG	36	70,6
348T>A_f	CAAAAGACCGAAGTTACGA A GCCCTTGTGCACTTCG	36	71,7
348T>A_r	CGAAGTGCACAAGGG C TCGTAACCTTCGGTCTTTTG	36	71,7
356T>C_f	GAAGTTACGATGCCCTT G CGCACTTCGGGAAGCG	34	74,3
356T>C_r	CGCTTCCCGAAGTG C CAAGGGCATCGTAACTTC	34	74,3
363C>T_f	GATGCCCTTGTGCACTT T GGGAAGCGGGGCTTG	33	74,5
363C>T_r	CAAGCCCCGCTTCCC A AAGTGCACAAGGGCATC	33	74,5
366G>T_f	GCCCTTGTGCACTTCGG T AAGCGGGGCTTGAACG	34	>75
366G>T_r	CGTTCAAGCCCCGCTT A CCGAAGTGCACAAGGGC	34	>75
381C>T_f	GGGAAGCGGGGCTTGA A TGTGGCCGCCACAGCGGC	35	>75
381C>T_r	GCCGCTGTGGCGGCCAC A TTCAAGCCCCGCTTCCC	35	>75
396G>A_f	GTGGCCGCCACAGC A GCTGTGATGGCTGCTTC	32	>75
396G>A_r	GAAGCAGCCATCACAGC T GCTGTGGCGGCCAC	32	>75
408T>A_f	GCGGCTGTGATGGC A GCTTCCAAGGTACTGTG	32	73,3
408T>A_r	CACAGTACCTTGAAGC T GCCATCACAGCCGC	32	73,3
417+1G>T_f	GTGATGGCTGCTTCCAAG T TACTGTGCTGGAAGTAC	36	71,7
417+1G>T_r	GTACTTCCAGCACAGTA A CTTGAAGCAGCCATCAC	36	71,7
Intron4_f	TAGGAATTCTGGTCCACCCTGGGTGCTTTC	30	69,5
Intron5_r	TAGCTCGAGCTGCAGTTTCTCCAGGCCTAAGTG	35	74,2

Nukleotide, welche die zu untersuchende Variante einführen, sind mit Fettdruck markiert; diejenigen Nukleotide, welche die Deletion einrahmen, sind unterstrichen; *Schmelztemperatur gemäß Herstellerangabe durch Eurofins MWG Operon

Tabelle 2 Weitere Primer mit Sequenz, Länge und Schmelztemperatur

Name des Primers	Sequenz (5'→3')	Länge [bp]	T _m [°C]*
<i>M13_f</i>	TGTAAAACGACGGCCAGT	18	53,7
<i>M13_r</i>	CAGGAAACAGCTATGACC	18	53,7
<i>pSPL3_f</i>	GTGAAGTGCAGTGTGACAAGCTGC	24	64,4
<i>pSPL3_r</i>	CACCTGAGGAGTGAATTGGTCG	22	62,1

*Schmelztemperatur gemäß Herstellerangabe durch Eurofins MWG Operon

4.3.2 Vektoren

Für die Aufnahme der PCR-Produkte (im Folgenden als Inserts bezeichnet) nach der zielgerichteten Mutagenese wurde der pCR4-TOPO Plasmidvektor (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Die Inserts umfassen das Exon 5 des *REEPI*-Gens sowie Teile der benachbarten Introns 4 und 5. Aufgrund seiner Eigenschaften ermöglicht der Vektor eine schnelle und effiziente Klonierung. Für die PCRs im Rahmen der zielgerichteten Mutagenese wurde die *Taq*-DNA-Polymerase eingesetzt, die an das 3'-Ende der PCR-Produkte einen zusätzlichen Adenosin-Rest (3'-A-Überhang) anfügt. Der TOPO-Vektor wird als lineares Molekül geliefert, besitzt ein Thymidinnukleotid am 3'-Ende und ist an das Enzym Topoisomerase I gekoppelt. Nachdem die Überhänge miteinander hybridisiert haben, verbindet die Topoisomerase I Vektor und Insert. Die Vektoreigenschaften geben dieser Klonierungstechnik den Namen TOPO-TA Klonierung.

Der Vektor wurde auch aufgrund weiterer spezifischer Eigenschaften ausgewählt (s. Abbildung 4). So besitzt er Resistenzen gegen Kanamycin und Ampicillin. Nur Bakterienkolonien, die den Vektor aufgenommen haben, sind somit in der Lage auf kanamycin- oder ampicillinhaltigen Agarplatten zu wachsen.

Desweiteren trägt der Vektor das sogenannte *lacZ*-Gen, das für das Enzym β -Galaktosidase kodiert. Unter Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) kommt es zur Expressierung der β -Galaktosidase, die das Galaktosid X-Gal schneidet. Dabei entsteht ein blauer Farbstoff. IPTG und X-Gal sind Bestandteile der Agarplatten (s. Tab. 6, Abschnitt 4.3.6, S. 21). Nach erfolgreicher Klonierung und Aufnahme eines Inserts durch den Vektor befindet sich dieses in der Mitte des *lacZ*-Gens und inaktiviert es. Das führt zu einer Weißfärbung der entsprechenden Bakterienkolonien. Mithilfe der Blau-Weiß-Selektion ist eine Identifikation derjenigen Kolonien möglich, die das Insert aufgenommen haben.

Die nachfolgende Abbildung zeigt den Vektor vor und nach Klonierung sowie die oben genannten Eigenschaften des Vektors.

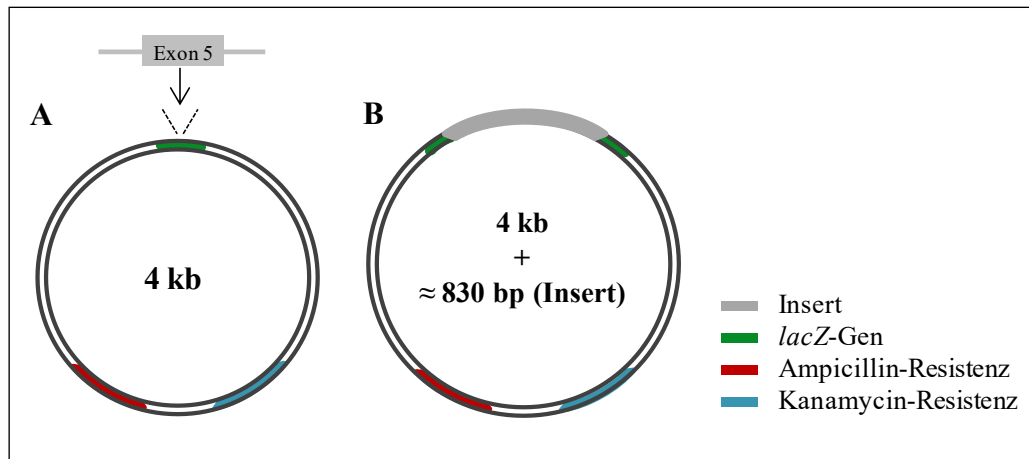


Abbildung 4 Struktur und Eigenschaften des TOPO-Vektors vor (A) und nach Klonierung (B)

Um überprüfen zu können, ob die zu untersuchenden Varianten einen Effekt auf das Spleißen der prä-mRNA haben, wurde ein Minigen-System verwendet. Aufgrund seiner Eigenschaften wurde dafür der pSPL3-Vektor (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ausgewählt. Der Vektor enthält zwei Exons sowie ein Intron mit einer multiplen Klonierungsstelle (MKS). Mittels Klonierung werden die Inserts im Bereich der MKS im Intron des Vektors eingebracht. Auch dieser Vektor verfügt über eine Ampicillin-Resistenz, sodass hier eine Selektion auf den ampicillinhaltigen Agarplatten möglich ist.

In Abbildung 5A und 5B ist der Vektor vor und nach Klonierung schematisch dargestellt. Vektoren, die ein Insert tragen, wurden in eukaryotische *HeLa*-Zellen transfiziert. Diese sind in der Lage prä-mRNA zu synthetisieren und zu spleißen, sodass mRNA entsteht, die ausschließlich exonische Sequenzen enthält. Bei Aufnahme eines leeren Vektors durch die *HeLa*-Zellen umfasst die mRNA die beiden Exons des Vektors (Abbildung 5C). Nach Transfektion eines Vektors mit Insert kann die gespleißte mRNA - je nach Auswirkung der untersuchten Variante - zu verschiedenen Ergebnissen führen. Im Falle der Wildtyp-DNA-Sequenz oder einer Variante ohne Auswirkung auf das prä-mRNA-Spleißen ist zu erwarten, dass die mRNA die beiden Exons des Vektors und das Exon 5 des *REEPI*-Gens umfasst (Abbildung 5D). Wenn die zu untersuchende Variante die Spleißstellen verändert, ist es möglich, dass das Exon 5 des *REEPI*-Gens herausgespleißt wird und die entstandene mRNA der des leeren Vektors entspricht (Abbildung 5E). Vorstellbar ist auch, dass eine zu untersuchende Variante zu einer neuen Spleißstelle führt und ein Spleißprodukt mit einer anderen Länge entsteht (Abbildung 5F).

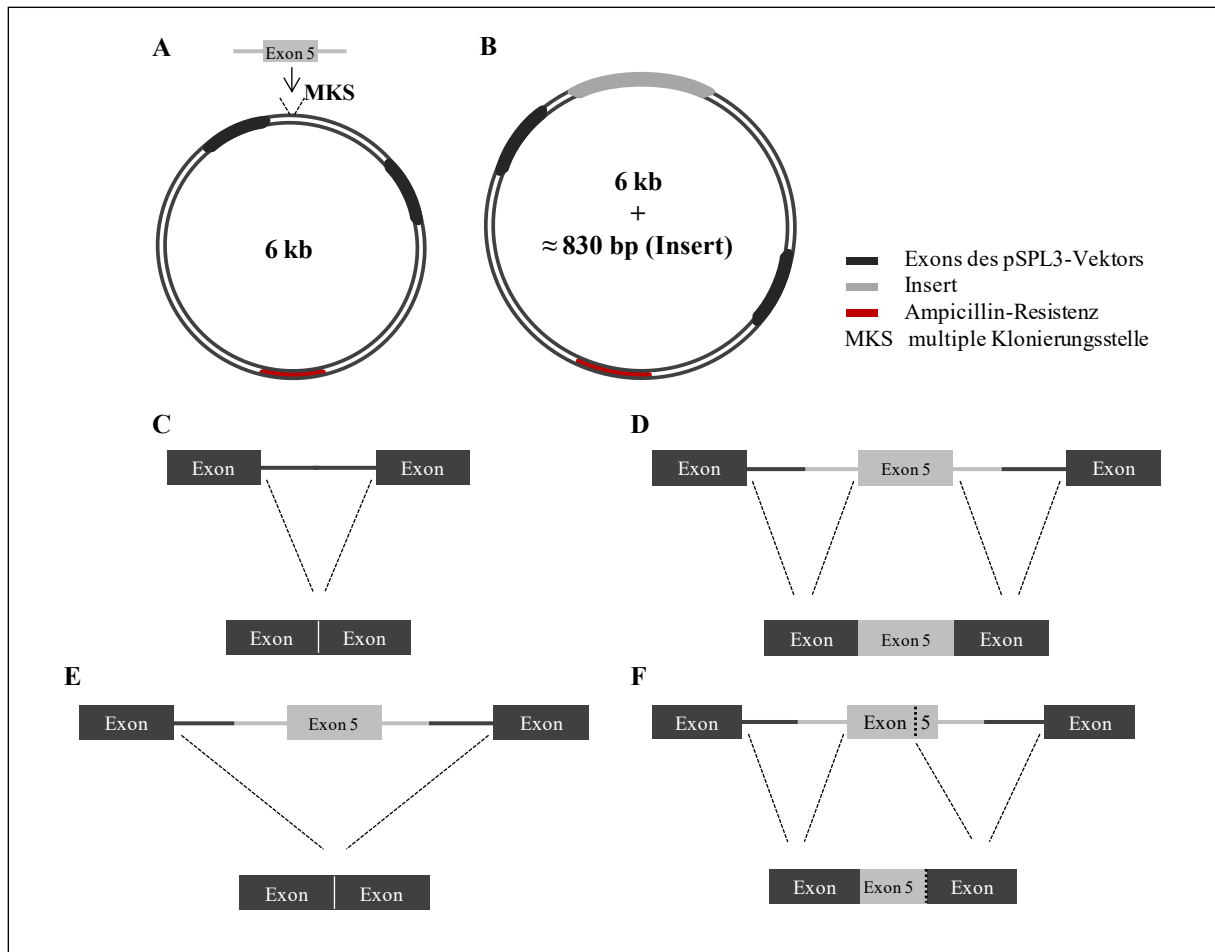


Abbildung 5 Struktur des pSPL3-Vektors vor und nach Klonierung und mögliche Auswirkungen der zu untersuchenden Varianten auf das Spleißen der prä-mRNA
pSPL3-Vektor vor (A) und nach Klonierung (B), (C) prä-mRNA-Spleißen des leeren Vektors, (D) prä-mRNA-Spleißen des Vektors nach Klonierung eines Wildtyp-Inserts oder Inserts mit einer Variante ohne Spleißeffekt, (E) prä-mRNA-Spleißen des Vektors nach Klonierung eines Inserts, dessen Variante zum Verlust einer Spleißstelle führt, (F) prä-mRNA-Spleißen des Vektors nach Klonierung eines Inserts, dessen Variante zu einer neuen Spleißstelle führt

4.3.3 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Alle Chemikalien, Reagenzien und Enzyme, die im Rahmen dieser Dissertation verwendet wurden, sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3 Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Enzyme mit genauer Bezeichnung und Name des Herstellers

Name	Bezeichnung des Herstellers	Hersteller
1 kb ladder	1 kb DNA ladder	GeneCraft
100 bp ladder	100 bp DNA ladder	GeneCraft
10x Puffer Tango	Tango Buffer (10x)	Thermo Scientific
10x Reaktionspuffer	Extra 10x reaction buffer	GeneCraft
Agar	Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth
Agarose	LE Agarose	Biozym Scientific

4. Material und Methoden

<i>Name</i>	<i>Bezeichnung des Herstellers</i>	<i>Hersteller</i>
<i>Ampicillin</i>	<i>Ampicillin sodium salt</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Dimethylformamid</i>	<i>Dimethylformamid</i>	<i>SERVA</i>
<i>DMEM</i>	<i>DMEM + GlutaMAX-I</i>	<i>Invitrogen</i>
<i>DNA-Ligase</i>	<i>T4 DNA Ligase</i>	<i>New England Biolabs</i>
<i>dNTPs</i>	<i>dNTP Sets</i>	<i>GeneCraft</i>
<i>DPBS</i>	<i>DPBS, no calcium, no magnesium</i>	<i>Gibco</i>
<i>EcoRI</i>	<i>EcoRI (10U/μl)</i>	<i>Thermo Scientific</i>
<i>EDTA</i>	<i>EDTA</i>	<i>ICN</i>
<i>Essigsäure</i>	<i>Acetic acid 100%</i>	<i>Carl Roth</i>
<i>Ethidiumbromid</i>	<i>Ethidium bromide</i>	<i>SERVA</i>
<i>FBS</i>	<i>Fetal bovine serum (South America Origin)</i>	<i>Biowest</i>
<i>H₂O</i>	<i>Ampuwa (water for injection)</i>	<i>Fresenius Kabi</i>
<i>Hefeextrakt</i>	<i>Yeast Extract for microbiology</i>	<i>Fluka</i>
<i>IPTG</i>	<i>IPTG</i>	<i>Invitrogen</i>
<i>Kanamycin</i>	<i>Kanamycin sulfate</i>	<i>SERVA</i>
<i>Lipofektamin</i>	<i>Lipofektamin 2000 Transfection Reagent</i>	<i>Invitrogen</i>
<i>Natriumchlorid</i>	<i>Sodium chloride</i>	<i>Merck</i>
<i>Opti-MEM</i>	<i>Opti-MEM (Reduced Serum Medium)</i>	<i>Invitrogen</i>
<i>Pen/Strep</i>	<i>Penicillin Streptomycin 10,000/ml</i>	<i>Invitrogen</i>
<i>PstI</i>	<i>PstI (10U/μl)</i>	<i>Gibco-BRL</i>
<i>Saccharose</i>	<i>Sucrose (research grade)</i>	<i>SERVA</i>
<i>SOC-Medium</i>	<i>S.O.C. Medium</i>	<i>Invitrogen</i>
<i>Taq-DNA-Polymerase</i>	<i>BioTherm Taq DNA polymerase</i>	<i>GeneCraft</i>
<i>Tris</i>	<i>Tris Pufferan</i>	<i>Carl Roth</i>
<i>Tris-HCl</i>	<i>Trizma hydrochloride</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Trypsin</i>	<i>Trypsin EDTA (0,25%), phenol red</i>	<i>Invitrogen</i>
<i>Trypton</i>	<i>Peptone from casein, tryptic digest</i>	<i>Fluka</i>
<i>Wachs</i>	<i>Chill Out 14 Liquid Wax, rot</i>	<i>Biozym Scientific</i>
<i>X-Gal</i>	<i>X-Gal</i>	<i>Thermo Scientific</i>
<i>Xylencyanol</i>	<i>Xylene cyanol FF</i>	<i>SERVA</i>

4.3.4 Kits

Tabelle 4 zeigt alle verwendeten Kits mit Herstellernamen und dem jeweiligen Arbeitsschritt.

Tabelle 4 Verwendete Kits mit Name des Herstellers und Angabe des Arbeitsschrittes

<i>Bezeichnung des Herstellers</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Arbeitsschritt</i>
<i>DNA Clean & Concentrator-5 Kit</i>	<i>Zymo Research</i>	<i>Aufreinigung nach Restriktion</i>
<i>PureYield Plasmid Miniprep System</i>	<i>Promega</i>	<i>Plasmidisolierung</i>
<i>RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	<i>Thermo Scientific</i>	<i>cDNA-Synthese</i>
<i>RNeasy Mini Kit</i>	<i>Qiagen</i>	<i>Ernte der Zellen und RNA-Isolation</i>
<i>TOPO TA Cloning Kit for Sequencing</i>	<i>Invitrogen</i>	<i>TOPO-TA Klonierung</i>
<i>Zymoclean Gel DNA Recovery Kit</i>	<i>Zymo Research</i>	<i>Gelextraktion</i>

4.3.5 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Alle für diese Dissertation verwendeten Verbrauchsmaterialien und Geräte sind mit Angabe des Herstellers Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5 Verbrauchsmaterialien und Geräte mit Bezeichnung und Name des Herstellers

<i>Gerät/Material</i>	<i>Bezeichnung des Herstellers</i>	<i>Hersteller</i>
<i>12-Well-Zellkulturpl.</i>	<i>BD Falcon Multiwell flat-bottom w/ lid (12 wells)</i>	<i>BD Biosciences</i>
<i>Cycler</i>	<i>FlexCycler</i>	<i>Analytik Jena</i>
<i>Electrophorese-</i> <i>kammern</i>	<i>HE33 Mini Horizontal Agarose Electrophoresis Unit</i>	<i>Hoefer</i>
<i>Elektrophorese-</i> <i>Netzteil</i>	<i>PerfectBlue Gelsystem Maxi S</i>	<i>Peqlab</i>
<i>Geldokumentations-</i> <i>system</i>	<i>Electrophoresis Power Supply EPS 301</i>	<i>Amersham Biosciences</i>
<i>Glaswaren</i>	<i>G:BOX F3</i>	<i>Syngene</i>
<i>Handschuhe</i>	<i>UV-Transilluminator</i>	<i>Biometra</i>
<i>Inkubatoren</i>	<i>Glaswaren</i>	<i>Schott Duran</i>
<i>Laborwaage</i>	<i>Vasco Nitril white</i>	<i>Braun</i>
<i>PCR-Platten</i>	<i>Heraeus Function Line Incubator</i>	<i>Thermo electron</i>
<i>Petrischalen</i>	<i>Laboratory shaking incubator 3033</i>	<i>GFL</i>
<i>Pipetten</i>	<i>LP3200D</i>	<i>Sartorius</i>
<i>Pipettenspitzen</i>	<i>PCR 96-Well TW-MT-plate</i>	<i>Biozym</i>
<i>Reaktionsgefäße</i>	<i>Petri Dishes</i>	<i>Greiner Bio-One</i>
<i>Skalpelle</i>	<i>Cellstar Serological Pipettes</i>	<i>Greiner Bio-One</i>
<i>Spektralphotometer</i>	<i>Discovery Comfort Pipette</i>	<i>Abimed</i>
<i>ThermoMixer</i>	<i>Finnpipette</i>	<i>Thermo Labsystems</i>
<i>Vortexmischer</i>	<i>Pipettenspitzen</i>	<i>Brand</i>
<i>Zentrifugen</i>	<i>Cellstar Tubes</i>	<i>Greiner Bio-One</i>
	<i>Reaction Tubes</i>	<i>Sarstedt</i>
	<i>Scalpels Praezisa Plus</i>	<i>Dahlhausen</i>
	<i>GeneQuant II RNA/DNA calculator</i>	<i>Pharmacia Biotech</i>
	<i>Thermomixer compact</i>	<i>Eppendorf</i>
	<i>Vortex-Genie 2</i>	<i>Scientific Industries</i>
	<i>Centrifuge 5415D</i>	<i>Eppendorf</i>

4.3.6 Stammlösungen, Puffer, Gele und Nährlösungen

Nachfolgend sind die verwendeten Stammlösungen sowie die Zusammensetzung der Puffer, Gele und Nährlösungen aufgelistet (Tabelle 6).

Tabelle 6 Zusammensetzung von Stammlösungen, Puffern, Gelen und Nährlösungen

<i>Name</i>	<i>Bestandteile</i>	<i>Menge</i>
<i>Stammlösung</i>	<i>X-Gal</i>	<i>2% in Dimethylformamid</i>
	<i>IPTG</i>	<i>100 mM in dH₂O</i>
	<i>Kanamycin</i>	<i>10 mg/ml in dH₂O</i>
	<i>Ampicillin</i>	<i>50 mg/ml in dH₂O</i>

4. Material und Methoden

<i>Name</i>	<i>Bestandteile</i>	<i>Menge</i>
<i>Agarose-Gele 1% bzw. 1,5%</i>	<i>Agarose</i>	<i>1 g bzw. 1,5 g</i>
	<i>Ethidiumbromid</i>	<i>2 µl</i>
	<i>1x TAE-Puffer</i>	<i>ad 100 ml</i>
<i>Gelladepuffer</i>	<i>Saccharose</i>	<i>4 g</i>
	<i>2 M Tris-HCl</i>	<i>0,5 ml</i>
	<i>0.5 M EDTA-Lösung, pH 8,0</i>	<i>2 ml</i>
	<i>Xylencyanol</i>	<i>4 mg</i>
	<i>ddH₂O</i>	<i>ad 10 ml</i>
<i>50x TAE-Puffer</i>	<i>Tris</i>	<i>242 g</i>
	<i>Eisessig (Essigsäure)</i>	<i>57,1 ml</i>
	<i>EDTA</i>	<i>14,7 g</i>
	<i>ddH₂O</i>	<i>ad 1000 ml</i>
<i>Cave: vor Gebrauch für Gele oder Puffer erfolgt eine Verdünnung auf 1x TAE mit ddH₂O</i>		
<i>Agarplatten (TOPO)</i>	<i>Trypton</i>	<i>10 g</i>
	<i>Hefeextrakt</i>	<i>5 g</i>
	<i>Natriumchlorid</i>	<i>10 g</i>
	<i>ddH₂O</i>	<i>ad 1000 ml, pH 7,2</i>
	<i>Agar</i>	<i>15 g</i>
	<i>Kanamycin (50 µg/ml)</i>	<i>50 mg</i>
	<i>IPTG-Stammlösung</i>	<i>2 ml</i>
	<i>X-Gal-Stammlösung</i>	<i>2 ml</i>
<i>Agarplatten (pSPL3)</i>	<i>Trypton</i>	<i>10 g</i>
	<i>Hefeextrakt</i>	<i>5 g</i>
	<i>Natriumchlorid</i>	<i>10 g</i>
	<i>ddH₂O</i>	<i>ad 1000 ml, pH 7,2</i>
	<i>Agar</i>	<i>15 g</i>
	<i>Ampicillin (50 µg/ml)</i>	<i>50 mg</i>
<i>flüssiges Nährmedium</i>	<i>Trypton</i>	<i>10 g</i>
	<i>Hefeextrakt</i>	<i>5 g</i>
	<i>Natriumchlorid</i>	<i>10 g</i>
	<i>ddH₂O</i>	<i>ad 1000 ml, pH 7,2</i>
<i>Wachstumsmedium</i>	<i>DMEM</i>	<i>89 ml</i>
	<i>FBS</i>	<i>10 ml</i>
	<i>Pen/Strep</i>	<i>1 ml</i>

4.4 Methoden

4.4.1 Schematische Darstellung der Abläufe

Abbildung 6 zeigt die durchgeführten Arbeitsschritte in chronologischer Reihenfolge.

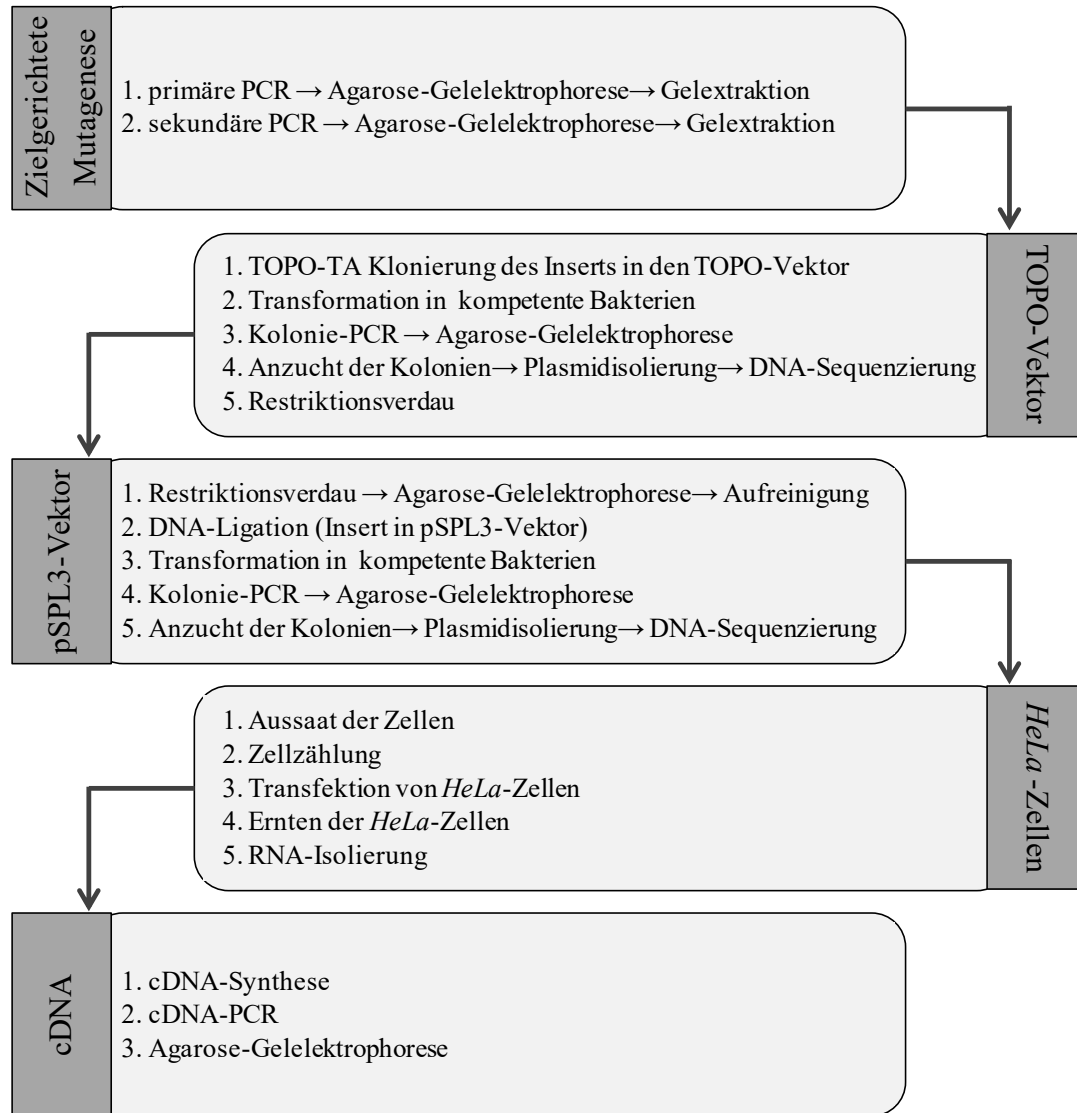


Abbildung 6 Arbeitsschritte in chronologischer Reihenfolge

4.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

4.4.2.1 Zielgerichtete Mutagenese mittels primärer und sekundärer PCR

Mithilfe der zielgerichteten Mutagenese wurden DNA-Stränge synthetisiert, welche die zu untersuchenden Varianten tragen. Für jede dieser mutierten DNAs war die Durchführung von primärer und sekundärer PCR erforderlich. Dabei wurden für jede Variante die Produkte der beiden primären PCRs als DNA-Vorlage (Template) für die sekundäre PCR verwendet. Nach

Abschluss der zielgerichteten Mutagenese trugen die mutierten DNA-Stränge jeweils eine der zu untersuchenden Varianten und umfassten das gesamte Exon 5 des *REEPI*-Gens sowie einen Teil der benachbarten Introns 4 und 5. Der detaillierte Ablauf der zielgerichteten Mutagenese ist in Abbildung 7 dargestellt. Anhand der Abbildung sind auch die für die einzelnen PCRs verwendeten Primer ersichtlich (Primer-Sequenzen s. Tabelle 1, Abschnitt 4.3.1, S. 16). Primer, welche eine zu untersuchende Variante tragen, wurden ausschließlich für die zielgerichtete Mutagenese eingesetzt.

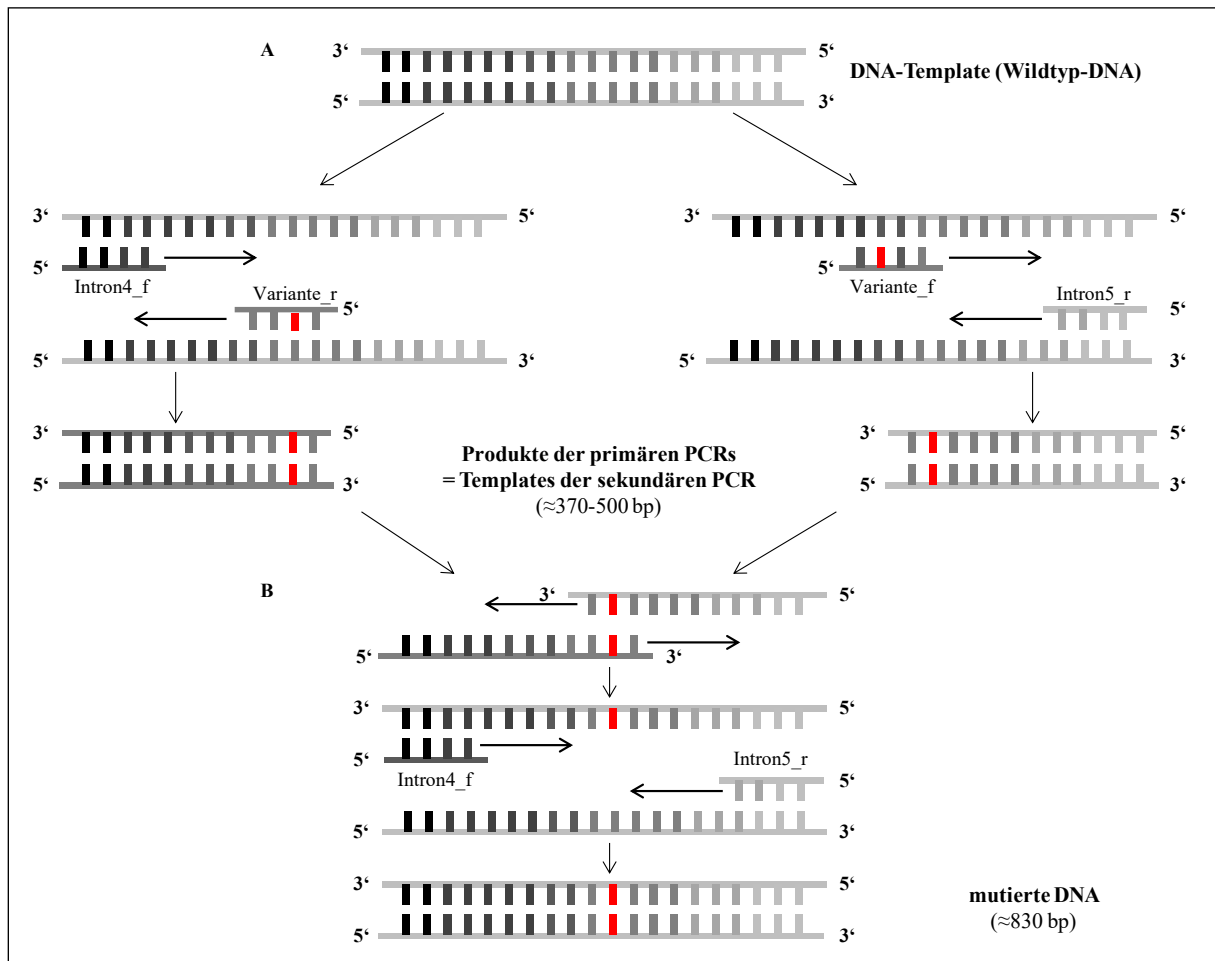


Abbildung 7 Ablauf der zielgerichteten Mutagenese mittels primärer (A) und sekundärer PCR (B)

Die für die primären und sekundären PCRs verwendeten PCR-Ansätze und das PCR-Programm sind nachfolgend aufgeführt. Letzteres war für beide PCRs identisch.

PCR-Ansatz für die primäre PCR		PCR-Ansatz für die sekundäre PCR	
dNTPs	0,2 µl	dNTPs	0,2 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,1 µl	Taq-DNA-Polymerase	0,2 µl
10x Reaktionspuffer	1,5 µl	10x Reaktionspuffer	2,0 µl
DNA-Template*	1,0 µl	DNA-Template**	1,0 µl
Primer Intron4_f/Variante_f	1,0 µl	Primer Intron4_f	1,0 µl
Primer Variante_r/Intron5_r	1,0 µl	Primer Intron5_r	1,0 µl
H ₂ O	10,2 µl	H ₂ O	14,6 µl
Gesamtvolumen	15,0 µl	Gesamtvolumen	20,0 µl

* humane Wildtyp-DNA (10ng/µl) ** aufgereinigte und vermischte Produkte der primären PCRs

PCR-Programm für primäre und sekundäre PCR			
Denaturierung	94°C	2:00 min	1x
Denaturierung	94°C	0:20 min	36x
Primerhybridisierung	60°C	0:20 min	
Verlängerung	72°C	0:40 min	
Abkühlen	4°C	∞	

4.4.2.2 Kolonie-PCR

Um die Bakterienkolonien zu identifizieren, die einen Vektor mit Insert aufgenommen haben, wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Diese erfolgten jeweils nach Transformation kompetenter Bakterien mit dem TOPO- bzw. dem pSPL3-Vektor. Anhand der Größe der PCR-Produkte konnte zwischen Kolonien mit leerem Vektor und solchen mit erfolgreich kloniertem Vektor unterschieden werden. Die Struktur der Vektoren, die Inserts und die Hybridisierungsstellen der für die Kolonie-PCRs eingesetzten Primer sind in Abbildung 8 dargestellt.

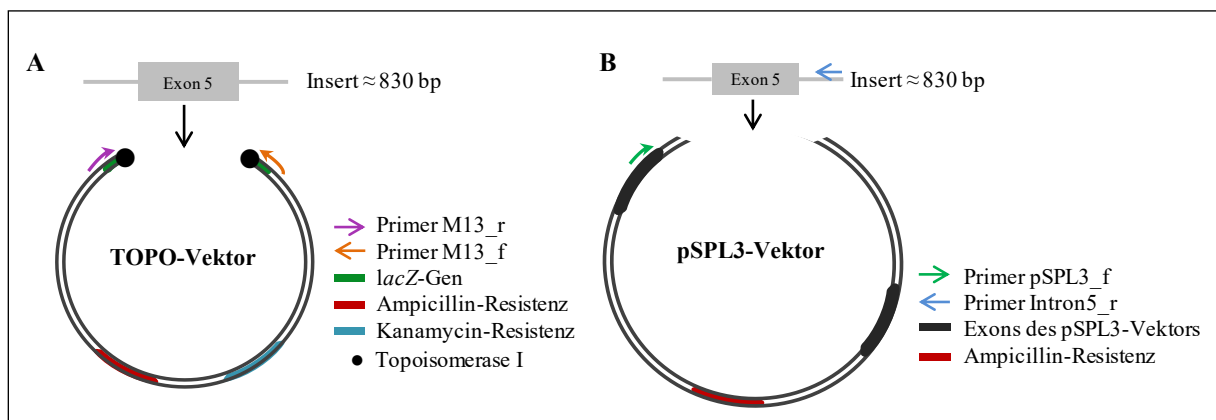


Abbildung 8 Vektoren und Inserts mit Primer-Hybridisierungsstellen für Kolonie-PCRs
(A) TOPO-Vektor, (B) pSPL3-Vektor

Die für die Kolonie-PCRs verwendeten PCR-Ansätze unterschieden sich für TOPO- und pSPL3-Vektor lediglich hinsichtlich der eingesetzten Primer, die PCR-Programme nur in der für die Primerhybridisierung benötigten Temperatur (s. unten). Die Bakterienkolonien wurden von der Agarplatte mithilfe eines sterilen Zahnstochers gepickt und auf diese Weise das DNA-Template für die Kolonie-PCR zum PCR-Ansatz transferiert.

PCR-Ansatz für die Kolonie-PCR		PCR-Programm für die Kolonie-PCR			
<i>dNTPs</i>	0,1 μ l	<i>Denaturierung</i>	94°C	2:00 min	1x
<i>Taq-DNA-Polymerase</i>	0,05 μ l	<i>Denaturierung</i>	94°C	0:20 min	32x
<i>10x Reaktionspuffer</i>	0,8 μ l	<i>Primerhybrid.</i>	56°C*/ 58°C**	0:20 min	
<i>M13_f*/pSPL3_f**</i>	0,8 μ l	<i>Verlängerung</i>	72°C	1:00 min	
<i>M13_r*/Intron5_r**</i>	0,8 μ l	<i>Abkühlen</i>	4°C	∞	
<i>H₂O</i>	5,45 μ l				
<i>Gesamtvolumen</i>	8,0 μ l				

*TOPO-Vektor, **pSPL3-Vektor

4.4.2.3 cDNA-PCR

Diese PCR wurde im Anschluss an die cDNA-Synthese durchgeführt. Die Länge der PCR-Produkte erlaubt Rückschlüsse auf die Auswirkung der untersuchten *REEP1*-Varianten auf das Spleißen der prä-mRNA, denn cDNA ist komplementär zu mRNA und beide enthalten ausschließlich exonische Sequenzen. Ergänzend zu Abb. 5, Abschnitt 4.3.2, S. 19 zeigt die nachfolgende Abbildung 9 mögliche Auswirkungen auf das prä-mRNA-Spleißen und damit die Länge der mRNAs. Außerdem sind die Hybridisierungsstellen der in der cDNA-PCR verwendeten Primer dargestellt.

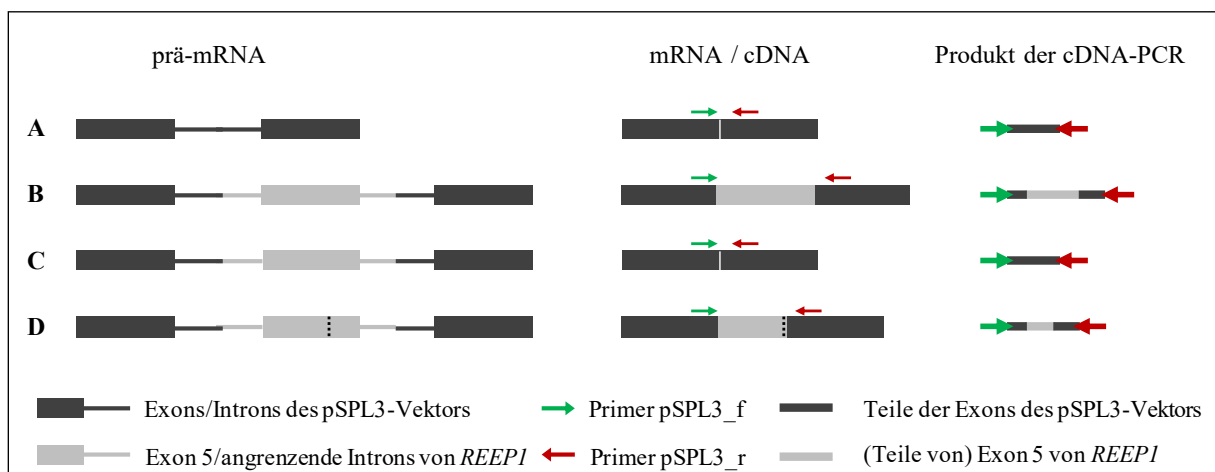


Abbildung 9 Primer-Hybridisierungsstellen für die cDNA-PCR und die möglichen Auswirkungen der untersuchten Varianten auf das prä-mRNA-Spleißen und die Länge der mRNAs
(A) leerer pSPL3-Vektor, (B) pSPL3-Vektor mit Wildtyp-Insert oder Insert mit einer Variante ohne Spleißeffekt, (C) pSPL3-Vektor mit Insert, dessen Variante mit Verlust einer Spleißstelle einhergeht, (D) pSPL3-Vektor mit Insert, dessen Variante zu einer neuen Spleißstelle führt

Der PCR-Ansatz und das PCR-Programm für die cDNA-PCR sind nachfolgend aufgeführt:

<i>PCR-Ansatz für die cDNA-PCR</i>		<i>PCR-Programm für die cDNA-PCR</i>			
<i>dNTPs</i>	<i>0,2 µl</i>	<i>Denaturierung</i>	<i>94°C</i>	<i>2:00 min</i>	<i>1x</i>
<i>Taq-DNA-Polymerase</i>	<i>0,1 µl</i>	<i>Denaturierung</i>	<i>94°C</i>	<i>0:10 min</i>	<i>32x</i>
<i>10x Reaktionspuffer</i>	<i>1,0 µl</i>	<i>Primerhybrid.</i>	<i>57°C</i>	<i>0:10 min</i>	
<i>DNA-Template (cDNA)</i>	<i>1,0 µl</i>	<i>Verlängerung</i>	<i>72°C</i>	<i>0:30 min</i>	
<i>Primer pSPL3_f</i>	<i>0,5 µl</i>	<i>Abkühlen</i>	<i>4°C</i>	<i>∞</i>	
<i>Primer pSPL3_r</i>	<i>0,5 µl</i>				
<i>H₂O</i>	<i>6,7 µl</i>				
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>10,0 µl</i>				

4.4.3 Gelelektrophorese

4.4.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Nach allen PCRs und dem Restriktionsverdau wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, um die Ergebnisse darzustellen. Die genaue Zusammensetzung sowie die Bestandteile der Gele sind Tab. 6, Abschnitt 4.3.6, S. 21 zu entnehmen.

Es wurden Agarose-Gele mit unterschiedlichen Konzentrationen verwendet: 1%ige Gele nach Kolonie-PCR und Restriktionsverdau und 1,5%ige Gele nach primärer und sekundärer PCR sowie nach cDNA-PCR. Das in den Gelen enthaltene Ethidiumbromid führt zur Sichtbarkeit doppelsträngiger DNA-Banden unter ultraviolettem Licht. Vor Verwendung härteten die Gele für 30 Minuten aus.

Zur Visualisierung der DNA-Banden wurde jede Probe vor dem Auftragen auf das Gel mit 2 µl Gelladepuffer versetzt, welcher die Probendichte erhöht, sodass diese besser in die Geltaschen sinken. Außerdem kann so jederzeit kontrolliert werden, wie weit die Proben im Gel gewandert sind und die Elektrophorese rechtzeitig beendet werden. Als Referenz für die Länge der entstandenen Banden wurde immer auch ein Marker (DNA ladder) als Größenstandard mitgeführt.

Für die Elektrophorese wurden die Gele in mit TAE-Puffer gefüllte Gelkammern gelegt. Die Laufzeit (30-45 Minuten) sowie die verwendete Spannung (90-155 V) wurden in Abhängigkeit vom Volumen des Gels gewählt (10 V pro 1 cm Elektrodenabstand). Für jede Elektrophorese betrug die Stromstärke 400 mA.

4.4.3.2 Gelextraktion

Im Anschluss an die primären und sekundären PCRs wurden die Produkte aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Im Falle der primären PCR wurden die beiden Produkte mit derselben

Variante vor der weiteren Aufbereitung vermischt. Für die Aufreinigung wurde das Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Irvine, USA) verwendet. Die einzelnen Schritte wurden bis auf wenige Ausnahmen entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Folgende Änderungen sind erfolgt: Die Proben wurden bei 13000 rpm zentrifugiert – im vierten Arbeitsschritt für eine Minute und im fünften Arbeitsschritt für 30 Sekunden (nach dem ersten Waschen) bzw. eine Minute (nach dem zweiten Waschen). Im letzten Schritt wurden 10 µl H₂O zum Eluieren der DNA verwendet.

4.4.4 Molekulares Klonieren

4.4.4.1 TOPO-TA Klonierung

Die Klonierung der Inserts in den pCR4-TOPO Plasmidvektor (s. Abb. 4, Abschnitt 4.3.2, S. 18) erfolgte unter Verwendung des TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, Carlsbad, USA). Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches ist nachfolgend dargestellt, die Inkubation erfolgte für 20 Minuten bei Raumtemperatur.

<i>Reaktionsgemisch für TOPO-TA Klonierung</i>	
<i>Salt Solution</i>	<i>0,67 µl</i>
<i>Vektor</i>	<i>0,33 µl</i>
<i>H₂O</i>	<i>2,0 µl</i>
<i>Produkt der sekundären PCR</i>	<i>1,0 µl</i>
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>4,00 µl</i>

4.4.4.2 Transformation kompetenter Bakterien

Mithilfe der Transformation ist es möglich, Plasmid-DNA (Insert in TOPO-Vektor) auf Bakterien zu übertragen. Im Falle der hier verwendeten *E.coli* Bakterien gibt es keine natürliche Kompetenz, sodass einige vorbereitende Schritte für eine erfolgreiche Transformation notwendig sind.

Nach Inkubation des Reaktionsgemisches für die TOPO-TA Klonierung wurde dieses zu 50 µl *E.coli* Bakterien (*Escherichia coli* XL1 blue von Stratagene) zugegeben. Nachdem die Zellen für 23-30 Minuten auf Eis gelagert worden sind, wurden sie für zwei Minuten bei einer Temperatur von 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Anschließend erfolgten eine zweiminütige Lagerung auf Eis und die Zugabe von 250 µl SOC-Medium („super optimal broth with catabolite repression“). Nach einstündiger Inkubation bei 37°C im Schüttelinkubator wurden die Zellen auf angewärmten Agarplatten ausgestrichen, die dann zur Inkubation über Nacht bei 37°C gelagert wurden.

Die Transformation des klonierten pSPL3-Vektors auf *E.coli* Bakterien erfolgte analog zur Transformation nach TOPO-TA Klonierung. Allerdings wurde im Falle des pSPL3-Vektors das Reaktionsgemisch der DNA-Ligation zu den *E.coli* Bakterien zugegeben. Die weiteren Schritte entsprechen dem oben stehenden Ablauf.

4.4.3.3 Anzucht der selektierten Bakterienkolonien

Die Kolonie-PCRs haben Bakterienkolonien identifiziert, die einen Vektor mit einem Insert aufgenommen haben. Einige dieser Kolonien wurden anschließend in flüssigem Nährmedium angezüchtet. Dafür wurden die ausgewählten Kolonien jeweils mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und dieser in ein Reaktionsgefäß mit 3 ml Nährmedium (Zusammensetzung s. Tab. 6, Abschnitt 4.3.6, S. 21) gegeben. Zusätzlich wurden 3 µl eines Antibiotikums mit einer Konzentration von 50 µg/ml hinzugegeben. Für Kolonien mit TOPO-Vektor handelte es sich um Kanamycin, für Kolonien mit pSPL3-Vektor um Ampicillin. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator.

4.4.4.4 Plasmidisolierung

Für die Isolierung der Plasmide wurde das PureYield Plasmid Miniprep System (Promega, Madison, USA) verwendet. Sie wurde entsprechend des Protokolls „alternative protocol for larger culture volumes“ durchgeführt. Für den zehnten Arbeitsschritt wurde der Elution Buffer verwendet. Im Anschluss an die Plasmidisolierung erfolgte die Messung der DNA-Konzentration im Spektralphotometer.

4.4.4.5 DNA-Sequenzierung

Mittels Sequenzierung ist es möglich zu überprüfen, ob die in den Vektor aufgenommenen Inserts tatsächlich die zu untersuchenden Varianten tragen. Die DNA-Sequenzierung wurde von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

Das Gesamtvolumen des Sequenzierungsmix betrug 15 µl. Davon entfielen jeweils 2 µl auf den verwendeten Primer (M13_f für TOPO-Vektor und pSPL3_f für pSPL3-Vektor). Abbildung 10 zeigt beide Vektoren mit den dazugehörigen Hybridisierungsstellen der Primer. Laut Vorgaben der Firma Eurofins sollten die zu sequenzierenden Proben einen DNA-Gehalt von 1000-1500 ng aufweisen. In Abhängigkeit von der DNA-Konzentration jeder Probe wurden die Volumina von DNA-Template und H₂O entsprechend berechnet (Gesamtvolumen 13 µl).

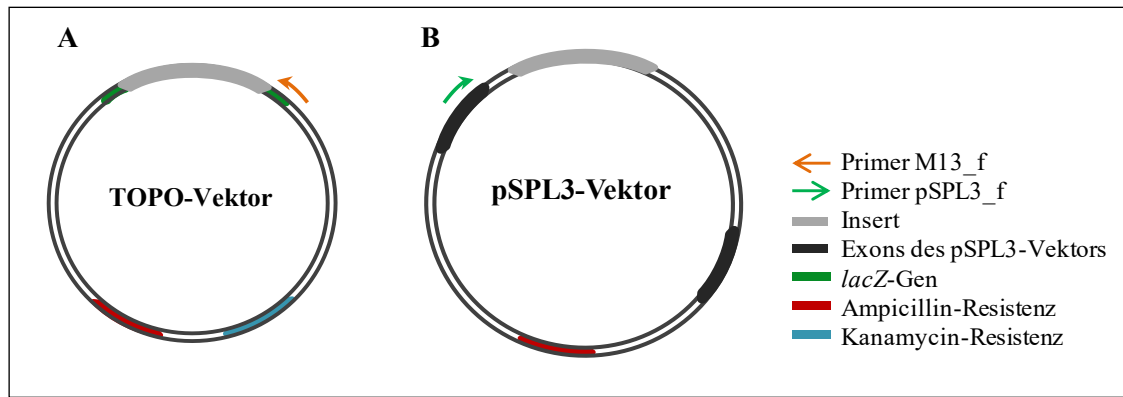


Abbildung 10 TOPO- (A) und pSPL3-Vektor (B) mit Insert und Hybridisierungsstellen der Primer zur DNA-Sequenzierung

4.4.4.6 Restriktionsverdau

Mithilfe des Restriktionsverdaus wurde das Insert aus dem TOPO-Vektor herausgeschnitten und der pSPL3-Vektor für die anschließende Aufnahme des Inserts vorbereitet. Sowohl das Insert als auch der pSPL3-Vektor verfügten über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* (5'→3': GAATTC) und *PstI* (5'→3': CTGCAG). In das Insert wurden diese über die Primer (Intron4_f und Intron5_r) eingefügt, der pSPL3-Vektor trug sie in seiner Klonierungsstelle. Abbildung 11 zeigt schematisch den Restriktionsverdau und die Lokalisation der Restriktionsschnittstellen in Insert und pSPL3-Vektor. Entsprechend der Schnittstellen wurden die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *PstI* verwendet.

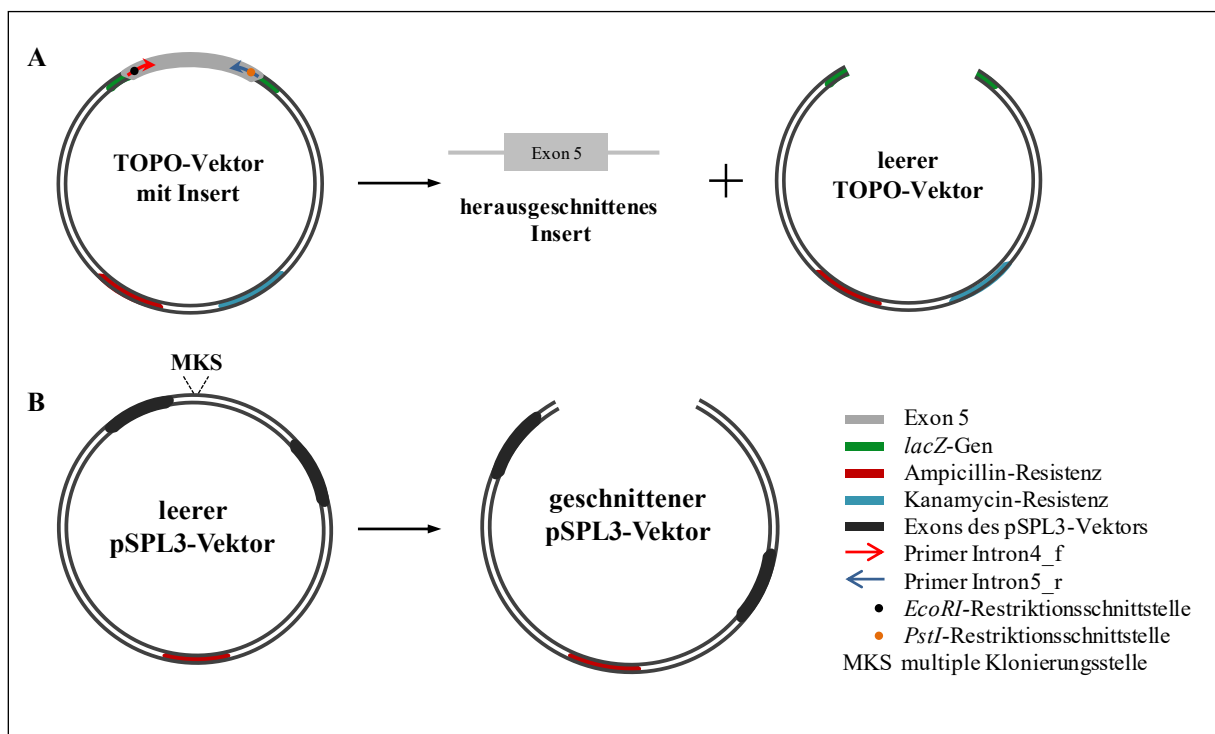


Abbildung 11 Restriktionsverdau von TOPO-Vektor mit Insert (A) und leerem pSPL3-Vektor (B)

Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für den Restriktionsverdau ist nachfolgend dargestellt. Die Restriktionsenzyme wurden vor Verwendung auf Eis gelagert und das Reaktionsgemisch wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

<i>Reaktionsgemisch für den Restriktionsverdau</i>		<i>Reihenfolge der Zugabe</i>
<i>EcoRI</i>	<i>0,8 µl</i>	<i>4</i>
<i>PstI</i>	<i>0,8 µl</i>	<i>3</i>
<i>10x Puffer Tango</i>	<i>4,0 µl</i>	<i>2</i>
<i>H₂O</i>	<i>10,4 µl</i>	<i>1</i>
<i>DNA (≈1000 ng)</i>	<i>4,0 µl</i>	<i>5</i>
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>20,0 µl</i>	

4.4.4.7 Aufreinigung der Produkte des Restriktionsverdaus

Vor der Aufreinigung wurden jeweils 3 µl des geschnittenen pSPL3-Vektors und 1 µl des herausgeschnittenen Inserts vermischt und mit 6 µl H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt.

Für die Aufreinigung wurde das DNA Clean & Concentrator-5 Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Alle Zentrifugationen wurden mit 13000 rpm durchgeführt und das Volumenverhältnis von DNA binding buffer zu DNA-Probe betrug 2:1. Abweichend vom Protokoll wurden die Proben im Anschluss an das zweite Waschen für eine Minute zentrifugiert und die DNA abschließend mit 10 µl H₂O eluiert.

4.4.4.8 DNA-Ligation

Die Klonierung der Inserts in den pSPL3-Vektor wurde mittels DNA-Ligation durchgeführt. Durch Restriktion des Vektors und des Inserts mit den gleichen Enzymen ist eine Hybridisierung der Enden möglich. Die DNA-Ligase verknüpft diese Enden zu einem ringförmigen Plasmid.

Die Zusammensetzung des Ligations-Ansatzes ist nachfolgend aufgeführt, die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

<i>Reaktionsgemisch für die DNA-Ligation</i>		<i>Reihenfolge der Zugabe</i>
<i>10x Reaktionspuffer</i>	<i>1,0 µl</i>	<i>1</i>
<i>DNA-Ligase</i>	<i>0,5 µl</i>	<i>2</i>
<i>aufgereinigte Produkte</i>	<i>8,5 µl</i>	<i>3</i>
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>10,0 µl</i>	

4.4.5 Transfektion von *HeLa*-Zellen

Die Kultivierung der *HeLa*-Zellen wurde von Mitarbeiterinnen gemäß den Standardverfahren durchgeführt. Die Arbeiten an den *HeLa*-Zellen wurden an sterilen Werkbänken durchgeführt.

4.4.5.1 Aussaat der Zellen

In Vorbereitung auf die eigentliche Transfektion erfolgte zunächst die Aussaat der *HeLa*-Zellen in 12-Well-Zellkulturplatten. Das im Verlauf benötigte Wachstumsmedium (Zusammensetzung s. Tab. 6, Abschnitt 4.3.6, S. 21) wurde zunächst im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Im ersten Schritt wurde das alte Wachstumsmedium vollständig von den Zellkulturschalen mit den *HeLa*-Zellen entfernt. Als nächstes wurden die Zellen mit 6 ml DPBS gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml Trypsin zum Ablösen der Zellen erfolgte die Inkubation für drei Minuten bei 37°C. Im nächsten Schritt wurden 9 ml des angewärmten Wachstumsmediums zugegeben und nach sorgfältigem Durchmischen die gesamte Suspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach anschließender Zentrifugation für drei Minuten bei 1200 rpm wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Das Zellpellet wurde zunächst mit 1 ml Wachstumsmedium resuspendiert, bevor weitere 9 ml Wachstumsmedium hinzugegeben wurden. Die Zellsuspension hatte damit ein Gesamtvolumen von 10 ml.

4.4.5.2 Zellzählung

Vor Aussaat der Zellen in die 12-Well-Zellkulturplatten wurden sie mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Dafür wurden 10 µl der Zellsuspension in die Zählkammer gegeben. Insgesamt wurden vier Quadrate ausgezählt und der arithmetische Mittelwert gebildet. Das Ergebnis wurde mit 10000 multipliziert und entspricht der Anzahl der Zellen in 10 ml Suspension. Pro Well wurden 50000 Zellen in einem Volumen von 2 ml benötigt. Das pro Well erforderliche Volumen (V) an Zellsuspension wurde wie folgt berechnet:

$$V \text{ [ml]} = \frac{\text{benötigte Zellzahl}}{\text{Zellzahl in 10 ml Zellsuspension}} * 10$$

Die Differenz zu den 2 ml Gesamtvolumen pro Well wurde mit Wachstumsmedium aufgefüllt und die 12-Well-Zellkulturplatten über Nacht bei 37°C im Inkubator gelagert.

4.4.5.3 Transfektion von *HeLa*-Zellen

Die eigentliche Transfektion der *HeLa*-Zellen erfolgte 16 Stunden nach der Aussaat. Das serumfreie Medium (Opti-MEM) wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Zunächst wurden unterschiedliche Reaktionslösungen hergestellt. Zum einen wurden pro Well 4 µl Lipofektamin und 96 µl Opti-MEM gemischt. Zum anderen wurde für jede zu untersuchende Variante eine Lösung aus 10 µl verdünnter DNA (100 ng/µl) und 90 µl Opti-MEM hergestellt. Die Inkubation erfolgte für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden jeweils 100 µl der Opti-MEM-Lipofektamin-Lösung zu jeder Opti-MEM-DNA-Lösung zugegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Kurz vor Ende der Inkubationszeit wurde das verbrauchte Wachstumsmedium von den 12-Well-Platten entfernt. Jede vorbereitete Lösung (Gesamtvolumen 200 µl) wurde in ein Well pipettiert und 800 µl Opti-MEM zugegeben. Die Verwendung eines serumfreien Mediums sollte dabei zu einer verbesserten Aufnahme der Plasmide durch die Zellen führen und die Chancen für eine erfolgreiche Transfektion erhöhen. Nach einer vierstündigen Inkubation bei 37°C wurde das serumfreie Medium entfernt und durch 2ml Wachstumsmedium ersetzt. Im Anschluss wurden die Zellen über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.4.6 Ernten der *HeLa*-Zellen und RNA-Isolierung

Das RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) wurde für die Ernte der *HeLa*-Zellen und die RNA-Isolierung verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend des Protokolls „animal cells spin“ und folgende Optionen wurden gewählt: Die Ernte wurde analog zu Arbeitsschritt 1b durchgeführt und die Zellen direkt lysiert. Im zweiten Schritt wurden 350 µl des RLT-Puffers verwendet. Das Lysat wurde, wie in Schritt 3a beschrieben, homogenisiert und abschließend 50 µl RNase-freies Wasser zur Eluierung der RNA eingesetzt.

4.4.7 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wird die RNA mithilfe des Enzyms reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben.

Verwendet wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA). Die Durchführung der einzelnen Arbeitsschritte erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Einzig die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches wurde adaptiert. Diese und das Protokoll der Inkubation sind nachfolgend dargestellt.

4. Material und Methoden

<i>Reaktionsgemisch für die cDNA-Synthese</i>		<i>Inkubationsprotokoll zur cDNA-Synthese</i>	
<i>RNA-Template</i>	<i>1,0 μl</i>	<i>25°C</i>	<i>5:00 min</i>
<i>Random Hexamer Primer</i>	<i>0,4 μl</i>	<i>42°C</i>	<i>60:00 min</i>
<i>Nuklease-freies Wasser</i>	<i>3,4 μl</i>	<i>70°C</i>	<i>5:00 min</i>
<i>5x Reaktionspuffer</i>	<i>1,6 μl</i>	<i>4°C</i>	∞
<i>RiboLock RNase inhibitor</i>	<i>0,4 μl</i>		
<i>dNTP-Mix</i>	<i>0,8 μl</i>		
<i>RevertAid RT</i>	<i>0,4 μl</i>		
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>8,0 μl</i>		

5. Ergebnisse

5.1 Relevante *REEP1*-Varianten nach Literaturrecherche

Von den zehn Suchergebnissen der Literaturrecherche enthielten fünf Publikationen Varianten mit Relevanz für diese Dissertation. Insgesamt wurden neun verschiedene *REEP1*-Varianten beschrieben. Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse der Literaturrecherche in Tabelle 7 zusammengefasst. Darin enthalten sind Bezeichnung und Lokalisation der jeweiligen Variante, die Literaturquelle, die voraussichtlichen Auswirkungen auf die Proteinsequenz und, sofern bekannt, die phänotypische Ausprägung.

Tabelle 7 *REEP1*-Varianten aus der Literatur mit ihren Eigenschaften

<i>REEP1</i> - Variante	Literaturquelle	Lokalisation	Proteinsequenz	Phänotyp
<i>c.304-2A>G</i>	Beetz et al. 2012	Intron 4	<i>p.102_139del</i>	<i>dHMN V</i>
<i>c.320T>C</i>	Schlang et al. 2008	Exon 5	<i>p.L107P</i>	<i>reine HSP</i>
<i>c.337C>T</i>	Hewamadduma et al. 2009	Exon 5	<i>p.R113X</i>	<i>komplizierte HSP</i>
<i>c.340_347del*</i>	Schlang et al. 2008	Exon 5	<i>p.69fsX</i>	<i>reine HSP</i>
<i>c.345C>A</i>	Schlang et al. 2008	Exon 5	<i>p.Y115X</i>	<i>reine HSP</i>
<i>c.366G>T</i>	Goizet et al. 2011	Exon 5	<i>p.G122GfsX46</i>	<i>komplizierte HSP</i>
<i>c.381C>T</i>	Beetz et al. 2008	Exon 5	<i>p.N127N</i>	<i>nicht bekannt</i>
<i>c.408T>A</i>	Beetz et al. 2008	Exon 5	<i>p.A136A</i>	<i>nicht bekannt</i>
<i>c.417+1G>T</i>	Beetz et al. 2008	Intron 5	<i>p.K139fs</i>	<i>reine HSP</i>

Vorausgesagte Änderungen in der Proteinsequenz sind fett gedruckt; *c.340_347delAGTTACGA

5.2 Relevante *REEP1*-Varianten nach Datenbankrecherche

Sieben, der für diese Dissertation relevanten Varianten waren im April 2014 in den Datenbanken EVS und dbSNP gelistet. Alle Varianten liegen im Exon 5 des *REEP1*-Gens und fünf sind als stille Mutationen beschrieben. Zwei der Varianten, *c.381C>T* und *c.408T>A*, waren bereits im Rahmen der Literaturrecherche (Beetz et al. 2008) beschrieben worden (s. oben). Zwei weitere Varianten, *c.348T>A* und *c.356T>C*, werden als Missense-Mutationen eingestuft.

Tabelle 8 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Datenbankrecherche. Alle Varianten sind mit ihrer Referenznummer (reference SNP identity, rs ID), der Allelfrequenz und der voraussichtlichen Auswirkung auf die Proteinsequenz dargestellt.

Tabelle 8 *REEP1*-Varianten aus den Datenbanken EVS und dbSNP mit ihren Eigenschaften

<i>REEP1</i> -Variante	<i>rs ID</i>	<i>Allelfrequenz</i>	<i>Proteinsequenz</i>
<i>c.345C>T</i>	<i>rs138656911</i>	<i>T:C= 0,008%</i>	<i>p.Y115Y</i>
<i>c.348T>A</i>	<i>rs377426129</i>	<i>A:T= 0,008%</i>	<i>p.D116E</i>
<i>c.356T>C</i>	<i>rs373171938</i>	<i>C:T= 0,008%</i>	<i>p.V119A</i>
<i>c.363C>T</i>	<i>rs369674332</i>	<i>T:C= 0,015%</i>	<i>p.F121F</i>
<i>c.381C>T</i>	<i>rs36008495</i>	<i>T:C= 0,45%</i>	<i>p.N127N</i>
<i>c.396G>A</i>	<i>rs377712421</i>	<i>A:G= 0,008%</i>	<i>p.A132A</i>
<i>c.408T>A</i>	<i>rs368965566</i>	<i>A:T= 0,008%</i>	<i>p.A136A</i>

Vorausgesagte Änderungen in der Proteinsequenz sind fett gedruckt

5.3 Mögliche Spleißeffekte der *REEP1*-Varianten nach *in-silico*-Analysen

5.3.1 Vorhersage möglicher Spleißstellen durch den Human Splicing Finder

Die Analyse der Spleißstellen der Wildtyp-Sequenz ergab sieben Spleißakzeptor- und eine Spleißdonorstelle. Letztere ist gleichzeitig die tatsächliche Spleißdonorstelle des Wildtyps (Wildtyp-Donor). Alle weiteren Spleißdonorstellen wurden aufgrund ihres CV<70 nicht für die Auswertung berücksichtigt. Die Spleißakzeptorstelle mit dem höchsten CV ist auch die tatsächliche Spleißakzeptorstelle des Wildtyps (Wildtyp-Akzeptor). Die vorausgesagten Spleißstellen der Wildtyp-Sequenz sind mit ihrer cDNA-Position, der DNA-Sequenz der Spleißstelle und dem CV in Tabelle 9 aufgelistet. In Abbildung 12 sind die Ergebnisse zudem grafisch, entsprechend ihrer Position im Gen, dargestellt.

Tabelle 9 Spleißstellen der Wildtyp-Sequenz nach Analyse mit HSF

<i>Spleißstelle</i>	<i>cDNA-Position</i>	<i>Sequenz (5'→3')</i>	<i>Consensus value</i>
<i>Akzeptor 1</i>	<i>c.304-12</i>	<i>ttcctttgacagGA</i>	91,47
<i>Akzeptor 2</i>	<i>c.317</i>	<i>gtctggtccaagCA</i>	75,10
<i>Akzeptor 3</i>	<i>c.323</i>	<i>tccaagcaaaagAC</i>	71,53
<i>Akzeptor 4</i>	<i>c.358</i>	<i>cacttcgggaagCG</i>	71,63
<i>Akzeptor 5</i>	<i>c.383</i>	<i>tggccgccacagCG</i>	83,25
<i>Akzeptor 6</i>	<i>c.406</i>	<i>gctgctccaagGT</i>	80,54
<i>Donor 1</i>	<i>c.415</i>	<i>AAGgtactg</i>	75,99
<i>Akzeptor 7</i>	<i>c.417+4</i>	<i>ctgtgctggaagTA</i>	73,77

Der tatsächliche Spleißakzeptor und -donor des Wildtyps sind fett gedruckt

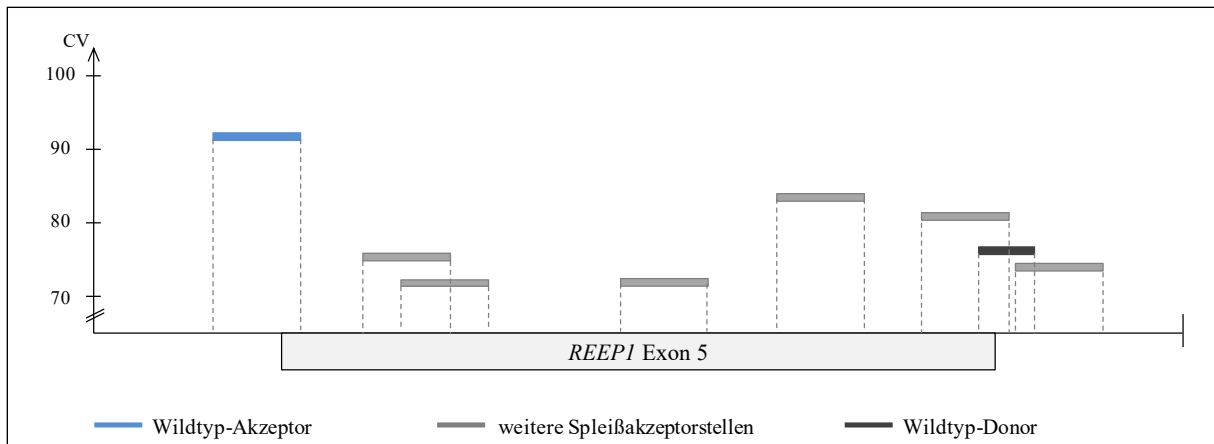


Abbildung 12 Spleißstellen der Wildtyp-Sequenz nach Analyse mit HSF

Die Variante c.304-2A>G wurde von Beetz et al. 2012 als Spleiß-Mutation im Bereich des Spleißakzeptors des Introns 4 beschrieben. Die Analyse mit dem HSF zeigt den Verlust des Wildtyp-Akzeptors (neuer CV<70). Die weiteren Spleißstellen sind unverändert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.

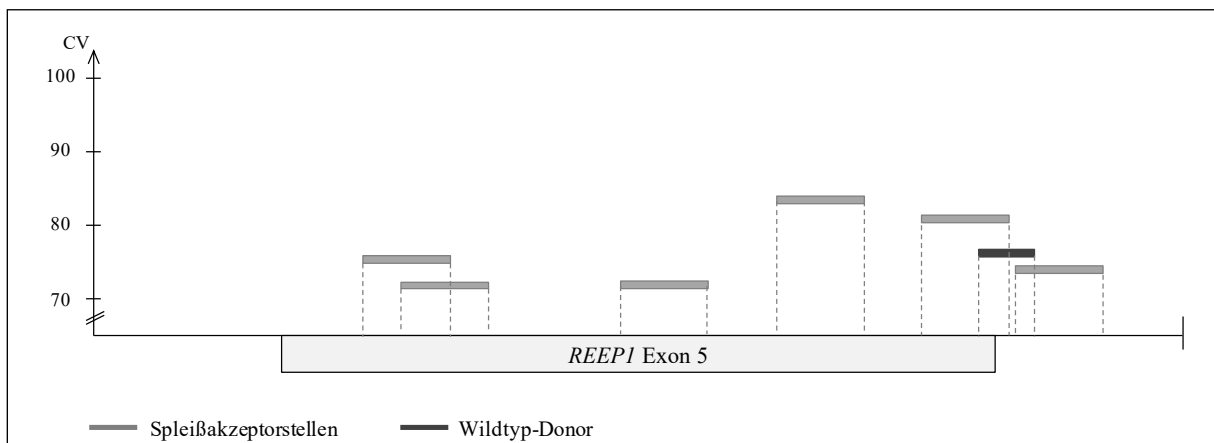


Abbildung 13 Spleißstellen der Variante c.304-2A>G nach Analyse mit HSF

Für die Variante c.366G>T ergibt die Analyse mittels HSF eine neue Spleißdonorstelle (TCGgtaagc) an Position c.362. Der dazugehörige CV von 91,07 liegt deutlich über dem des Wildtyp-Donors (CV=75,99). Außerdem führt diese Variante zu einer leichten Verringerung des CV von Spleißakzeptor 4 (nicht dargestellt). Die Wildtyp-Spleißstellen sowie die neue Spleißdonorstelle der Variante c.366G>T sind Abbildung 14 zu entnehmen.

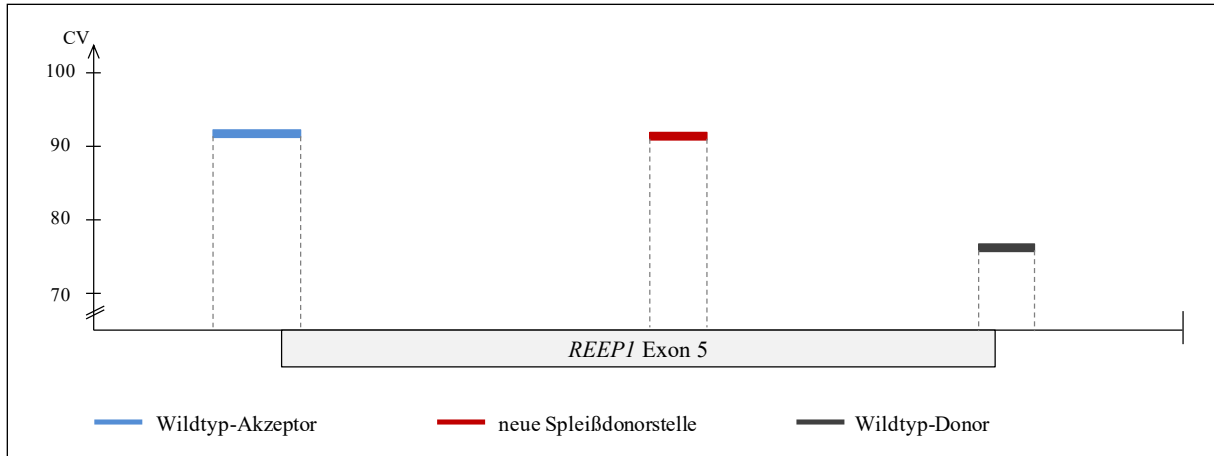


Abbildung 14 Wichtige Spleißstellen der Variante c.366G>T nach Analyse mit HSF

Beetz et al. 2008 haben die Variante c.417+1G>T als Spleiß-Mutation im Spleißdonor des Introns 5 beschrieben. Die Analyse der Variante mittels HSF zeigt den Verlust des Wildtyp-Donors an Position c.415. Gleichzeitig entsteht eine neue Spleißdonorstelle (CAAgttact) an Position c.414, die einen CV von 72,38 aufweist. Weiterhin verringert sich auch der CV des Akzeptors 6 (nicht dargestellt) geringfügig. In Abbildung 15 sind für die Variante c.417+1G>T der Wildtyp-Akzeptor, die neue Spleißdonorstelle und der Verlust des Wildtyp-Donors dargestellt.

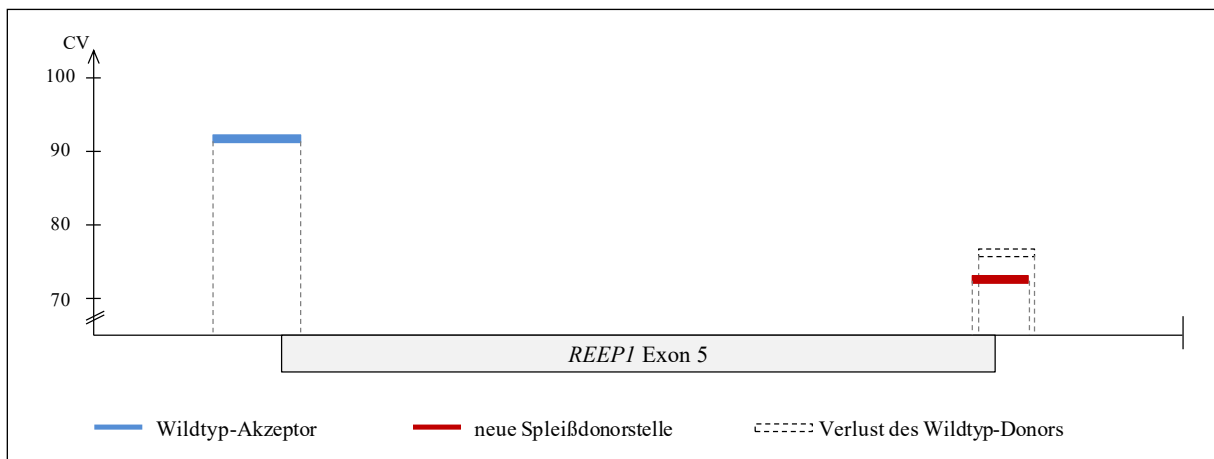


Abbildung 15 Wichtige Spleißstellen der Variante c.417+1G>T nach Analyse mit HSF

Für die Varianten c.396G>A und c.408T>A resultiert die Analyse mit dem HSF in neuen Spleißakzeptorstellen (ohne Abbildung). Im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz findet sich für die stille Mutation c.396G>A an der Position c.386 eine neue Spleißakzeptorstelle (ccgccacagcagCT) mit einem CV von 81,72. Für die Variante c.408T>A entsteht an Position c.398 eine neue Spleißakzeptorstelle (ctgtgatggcagCT) mit einem CV von 81,49. In beiden

Fällen handelt es sich nach Klassifikation des HSF um starke Spleißstellen mit einem $CV > 80$. Allerdings hat der Wildtyp-Akzeptor den deutlich höheren CV und auch der CV des Akzeptors 5, der offensichtlich nicht zum Spleißen des Wildtyps genutzt wird, liegt über dem der neuen Spleißakzeptorstellen. Die Analyse beider Varianten zeigt außerdem leichte Verringerungen im CV einer weiteren Spleißakzeptorstelle.

Die Varianten c.320T>C und c.363C>T führen zu einer geringen Verringerung des CV einer einzelnen Spleißakzeptorstelle (ohne Abbildung).

Die Analyse der Spleißstellen mithilfe des HSF zeigt für die Varianten c.337C>T, c.345C>A, c.345C>T, c.348T>A, c.356T>C und c.381C>T keine Änderungen im Vergleich zu den Spleißstellen der Wildtyp-Sequenz. Für diese Varianten gibt es ebenso wie für die Variante c.340_347del keine grafischen Darstellungen der Ergebnisse. Auch im Falle der Deletion sind die Spleißstellen identisch mit denen der Wildtyp-Sequenz. Durch den Verlust von acht Basen verschiebt sich lediglich die cDNA-Position der nachfolgenden Spleißstellen nach vorn. Sequenz und CV der einzelnen Spleißstellen sind unverändert.

Zusammenfassend ergibt die Analyse der Spleißstellen mittels HSF für drei der untersuchten Varianten potentiell relevante Veränderungen: Verlust des Wildtyp-Akzeptors in Variante c.304-2A>G, Entstehung einer neuen Spleißdonorstelle mit dem höchsten CV in Variante c.366G>T und für Variante c.417+1G>T der Verlust des Wildtyp-Donors bei gleichzeitigem Auftreten einer neuen Spleißdonorstelle.

5.3.2 Vorhersage möglicher Spleißstellen durch den Fruit Fly Splice Site Predictor

Die Analyse der Wildtyp-Sequenz resultierte in einem Wildtyp-Akzeptor und einem Wildtyp-Donor. Der Akzeptor hat einen Score von 0,98 und liegt am Übergang von Intron 4 zu Exon 5. Das die Spleißakzeptorstelle charakterisierende AG-Dinukleotid befindet sich an Position c.304-2 und das Motiv dieser Spleißstelle umfasst die Positionen 2 bis 42 der analysierten Sequenz (Abb. 3, Abschnitt 4.2, S.14). Der Donor mit dem GT-Nukleotid an Position c.417+1 befindet sich am Übergang von Exon 5 zu Intron 5, hat einen Score von 0,78 und das Motiv dieser Spleißdonorstelle erstreckt sich von Position 130 bis 144 der analysierten Sequenz. Die Ergebnisse der Analyse der Wildtyp-Sequenz sind in Abbildung 16A dargestellt.

Die Analyse der zu untersuchenden Varianten führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die Variante c.304-2A>G führt zu einem Verlust des AG-Dinukleotids und damit zu einem Verlust der Spleißakzeptorstelle (Abbildung 16B). Gleiches zeigt sich für den Wildtyp-Donor in der Variante c.417+1G>T. Durch Verlust des GT-Dinukleotids kommt es zum Wegfall der Spleißdonorstelle (Abbildung 16D).

Die Analyse der Variante c.366G>T ergab eine neue Spleißdonorstelle mit GT-Dinukleotid an Position c.365. Mit einem Score von 0,99 ist dieser Donor deutlich stärker als der koexistierende Wildtyp-Donor. Das Motiv der neuen Spleißdonorstelle umfasst die Positionen 77 bis 91 der analysierten Sequenz. Das Ergebnis der Analyse für die Variante c.366G>T zeigt Abbildung 16C.

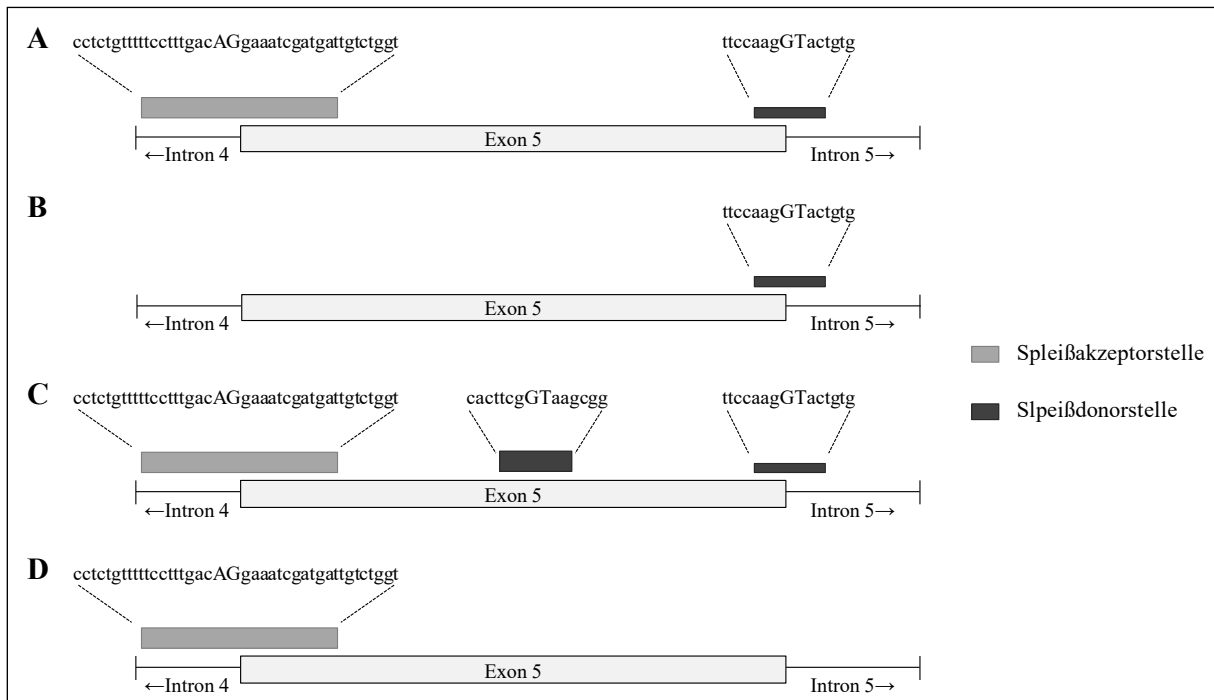


Abbildung 16 Spleißstellen mit Lokalisation und Motiv nach Analyse mit Fruit Fly Splice Predictor (A) Wildtyp, (B) c.304-2A>G, (C) c.366G>T, (D) c.417+1G>T; die Höhe der Balken entspricht dem Score der Spleißstellen

Die Analysen der folgenden *REEP1*-Varianten unterscheiden sich nicht von der des Wildtyps: c.337C>T, c.345C>A, c.345C>T, c.348T>A, c.356T>C, c.363C>T, c.381C>T, c.396G>A und c.408T>A (ohne Abbildung).

Durch die Deletion in Variante c.340_347del verschiebt sich die Position der Spleißdonorstelle um acht Positionen. Aufgrund einer Änderung des Motivs der Spleißakzeptorstelle in Variante c.320T>C erhöht sich deren Score minimal auf 0,99 (ohne Abbildungen).

5.3.3 Analyse exonischer Spleißverstärker mittels ESEfinder

Mithilfe des ESEfinders wurden für die Wildtyp-Sequenz 27 exonische Spleißverstärker identifiziert. Auf die vom Programm berücksichtigten SR-Proteinen verteilen sich diese wie folgt: SRSF1 (4), SRSF1-IgM-BRCA1 (7), SRSF2 (8), SRSF5 (4) und SRSF6 (4). Für jedes

SR-Protein gibt es einen eigenen Schwellenwert und nur ESEs, deren Score höher als der Schwellenwert liegt, werden aufgeführt. Alle ESEs der Wildtyp-Sequenz sind mit ihrem jeweiligen Schwellenwert in Abbildung 17A und B dargestellt.

Die Analyse von ESEs für die Variante c.304-2A>G führt zu vier Veränderungen: zwei ESEs gehen verloren (SRSF1 und SRSF1-IgM-BRCA1), ein ESE entsteht neu und für einen weiteren verringert sich der Score (beide SRSF5). Die Ergebnisse für Variante c.304-2A>G zeigt Abbildung 17C.

Variante c.320C>T bedingt ebenfalls Veränderungen: ein ESE entsteht neu (SRSF1-IgM-BRCA1), ein weiterer hat einen geringeren Score (SRSF5). Abbildung 17G zeigt die Ergebnisse.

Die Variante c.337C>T geht mit folgenden Veränderungen einher: ein neu entstandener ESE (SRSF1), Verlust eines ESEs (SRSF1-IgM-BRCA1) und abweichende Scores für zwei weitere ESEs (SRSF1-IgM-BRCA1 und SRSF2; siehe Abbildung 17D).

In zwei Varianten werden ausschließlich neue ESEs gefunden: drei ESEs für Variante c.356T>C (SRSF1, SRSF1-IgM-BRCA1 und SRSF6, siehe Abbildung 17H) und ein neuer ESE für Variante c.366G>T (SRSF1-IgM-BRCA1, siehe Abbildung 17E).

Die Variante c.396G>A ist diejenige mit den meisten Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp: es gibt fünf ESEs mit abweichendem Score (SRSF1 [2], SRSF1-IgM-BRCA1 [2] und SRSF6) und es kommt zum Verlust von zwei weiteren ESEs (SRSF1 und SRSF1-IgM-BRCA1). Eine Übersicht ist in Abbildung 17I dargestellt.

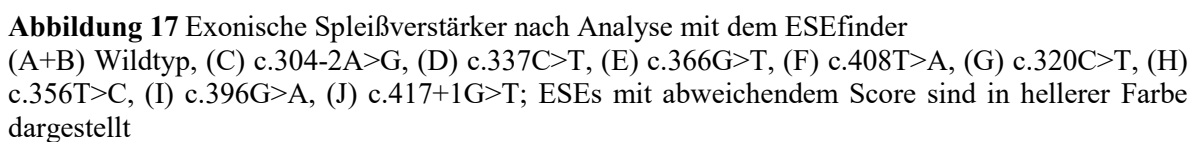
Die Analyse der Variante c.408T>A ergibt einen neuen ESE (SRSF2), zwei weitere gehen verloren (SRSF2 und SRSF6, siehe Abbildung 17F).

Auch für die Variante c.417+1G>T ergeben sich Änderungen: Entstehung von zwei neuen ESEs (SRSF2 und SRSF5) sowie Verlust von zwei ESEs (SRSF1-IgM-BRCA1 und SRSF2).

Die Ergebnisse zeigt Abbildung 17J.

Für die nachfolgenden Varianten ergeben sich nur kleine Veränderungen (ohne Abbildungen): bei den Varianten c.348T>A und c.381C>T verringert sich der Score eines einzelnen ESEs. Aufgrund der Deletion in Variante c.340_347del gehen zwei ESEs verloren und der Score eines weiteren erhöht sich.

Die Analysen der Varianten c.345C>A, c.345C>T und c.363C>T führen zum gleichen Ergebnis wie die Analyse der Wildtyp-Sequenz.



Die Analyse der Wildtyp-Sequenz ergab elf exonische Spleißverstärker, die in Abbildung 18A mit ihrer Lokalisation dargestellt sind.

Zusätzliche ESEs fanden sich für die folgenden Varianten: c.337C>T (4), c.345C>A (2), c.345C>T (1) und c.348T>A (1). Die Ergebnisse zeigen die Abbildungen 18C bis F.

Bei zwei Varianten kommt es zu einem Verlust von ESEs: zwei in Variante c.304-2A>G (Abbildung 18B) und einer in Variante c.363C>T (Abbildung 18G).

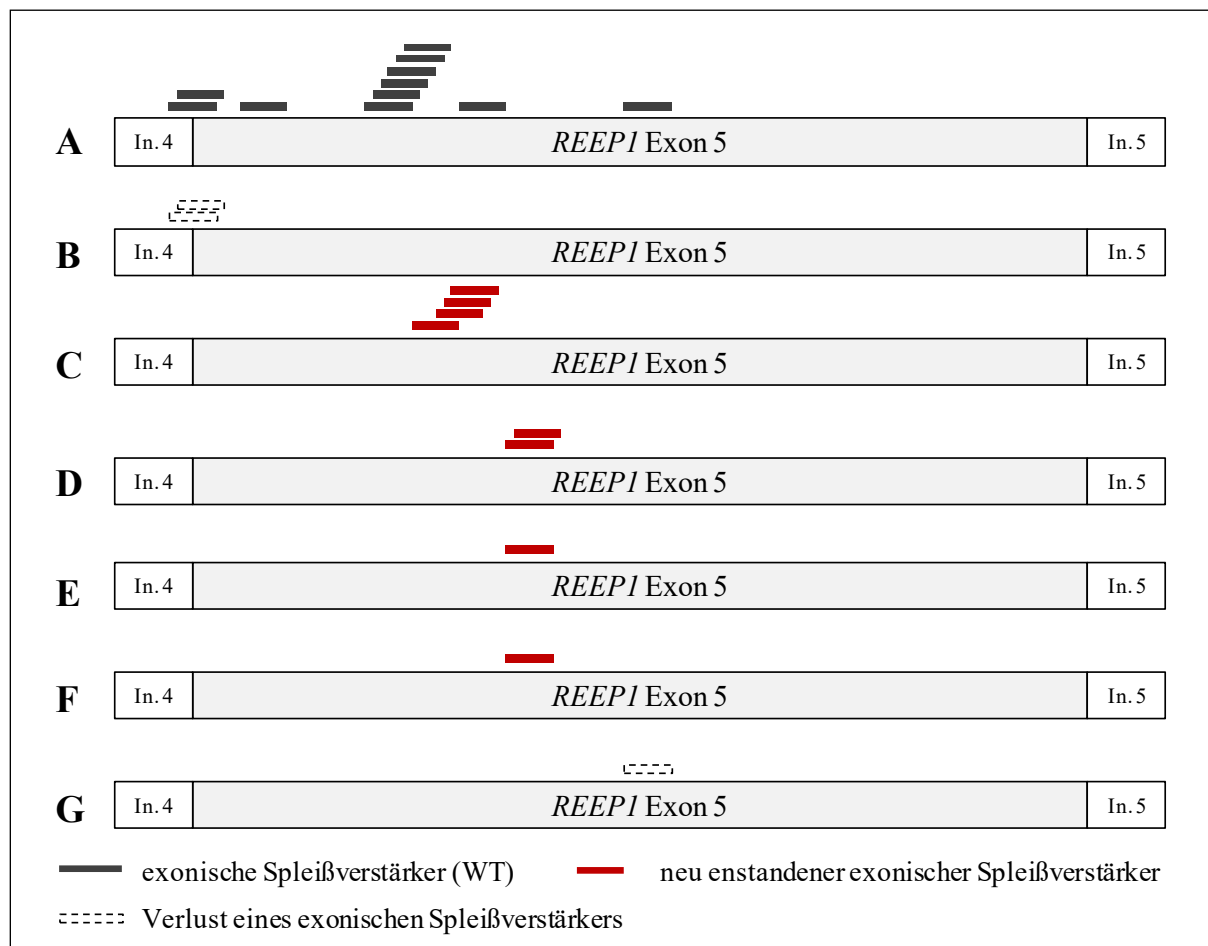


Abbildung 18 Exonische Spleißverstärker nach Analyse mit RESCUE-ESE Web Server
 (A) Wildtyp, (B) c.304-2A>G, (C) c.337C>T, (D) c.345C>A; (E) c.345C>T, (F) c.348T>A, (G) c.363C>T

Aufgrund der acht Basen umfassenden Deletion in Variante c.340_347del kommt es zum Verlust des zehnten ESEs (ohne Abbildung). Für die Varianten c.320C>T, c.356T>C, c.366G>T, c.381C>T, c.396G>A, c.408T>A und c.417+1G>T entsprechen die Ergebnisse denen der Wildtyp-Sequenz.

5.3.5 Vergleich der *in-silico*-Analysen

Die Vorhersage möglicher Spleißstellen durch die Programme Human Splicing Finder und Fruit Fly Splice Site Predictor führte im Wesentlichen zu gleichen Ergebnissen. In beiden

Fällen zeigen sich der Verlust des Wildtyp-Akzeptors in Variante c.304-2A>G und des Wildtyp-Donors in Variante c.417+1G>T sowie die Entstehung einer neuen, starken Spleißdonorstelle in Variante c.366G>T. Der einzige Unterschied zeigt sich bei der neu entstandenen Spleißdonorstelle in Variante c.417+1G>T, welche nur durch den HSF detektiert wurde. Die Ergebnisse der Vorhersage der Spleißstellen sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10 Vergleich der Spleißstellen nach Analyse durch HSF und Fruit Fly Splice Site Predictor

<i>REEPI-Variante</i>	<i>Wildtyp-Akzeptor</i>		<i>Wildtyp-Donor</i>		<i>weitere Spleißdonorstellen</i>	
	<i>HSF</i>	<i>Fruit Fly</i>	<i>HSF</i>	<i>Fruit Fly</i>	<i>HSF</i>	<i>Fruit Fly</i>
c.304-2A>G	-	-	=	=	=	=
c.366G>T	=	=	=	=	+	+
c.417+1G>T	=	=	-	-	+	=

+ Entstehung einer neuen Spleißstelle, - Verlust einer Spleißstelle, = unveränderte Spleißstelle

Die Analysen hinsichtlich exonischer Spleißverstärker führen für RESCUE-ESE Web Server und ESEfinder zu unterschiedlichen Ergebnissen. Der RESCUE-ESE Web Server findet für insgesamt sieben Varianten (c.320C>T, c.356T>C, c.366G>T, c.381C>T, c.396G>A, c.408T>A und c.417+1G>T) keine Veränderungen im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz. Beim ESEfinder entsprechen die Analysen von drei Varianten der des Wildtyps, wobei hier berücksichtigt werden muss, dass der ESEfinder auch den veränderten Score eines ESEs angibt.

Identische Ergebnisse hinsichtlich Verlust und Neuentstehung von ESEs ergeben die Analysen für die Varianten c.340_347del und c.381C>T. Betrachtet man die Ergebnisse einzeln bezüglich Verlust oder Neuentstehung von ESEs, dann zeigen beide Programme eine höhere Übereinstimmung. Tabelle 11 stellt eine Übersicht dar.

Tabelle 11 Vergleich der ESEs nach Analyse durch RESCUE-ESE Web Server und ESEfinder

<i>REEPI-Variante</i>	<i>zusätzlicher ESE</i>		<i>Verlust eines ESE</i>		<i>veränderter Score</i>
	<i>RESCUE</i>	<i>ESEfinder</i>	<i>RESCUE</i>	<i>ESEfinder</i>	<i>ESEfinder</i>
c.304-2A>G		✓	✓	✓	✓
c.320T>C		✓			✓
c.337C>T	✓	✓		✓	✓
c.340_347del			✓	✓	✓
c.345C>A	✓				
c.345C>T	✓				
c.348T>A	✓				✓

5. Ergebnisse

<i>REEP1</i> -Variante	zusätzlicher ESE		Verlust eines ESE		veränderter Score ESEfinder
	RESCUE	ESEfinder	RESCUE	ESEfinder	
c.356T>C		✓			
c.363C>T			✓		
c.366G>T		✓			
c.381C>T					✓
c.396G>A				✓	✓
c.408T>A		✓		✓	
c.417+1G>T		✓		✓	

✓ abweichende ESEs im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz

5.4 Klonierung der *REEP1*-Varianten in den pSPL3-Vektor

5.4.1 Primäre und sekundäre PCRs zur zielgerichteten Mutagenese

Der erste Schritt der zielgerichteten Mutagenese umfasste für jede zu untersuchende Variante zwei primäre PCRs. Bei den entstandenen Produkten handelt es sich um DNA-Stränge, welche jeweils eine der zu untersuchenden Varianten sowie Teile des Exons 5 und der benachbarten Introns 4 oder 5 des *REEP1*-Gens enthalten (s. Abb. 7, Abschnitt 4.4.2.1, S. 24). Abhängig von der cDNA-Position der jeweiligen Variante liegt die erwartete Größe der PCR-Produkte bei 370 bis 500bp. Abbildung 19 zeigt exemplarisch die Ergebnisse einiger primärer PCRs. Für jede Variante wurde eine Negativkontrolle mit Wasser anstelle eines DNA-Templates mitgeführt, zu Vergleichszwecken außerdem eine PCR mit den Primern Intron4_f vs. Intron5_r (Primer-Hybridisierungsstellen s. Abb. 11A, Abschnitt 4.4.4.6, S. 30). Wie zu erwarten ist dieses PCR-Produkt deutlich größer als das der primären PCRs.

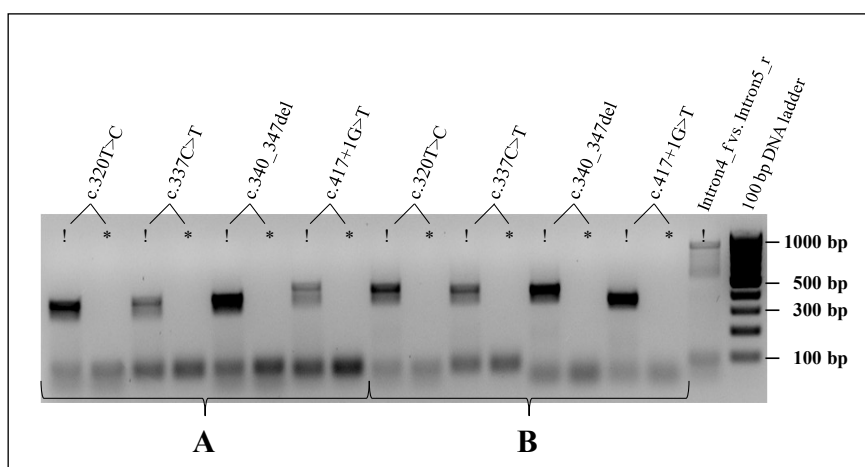


Abbildung 19 Exemplarische Ergebnisse primärer PCRs nach Agarose-Gelelektrophorese (1,5%) (A) Primer Intron4_f vs. Variante_r, (B) Primer Intron5_r vs. Variante_f, (!) PCR mit DNA-Template, (*) Negativkontrollen mit Wasser

Die sekundären PCRs stellten den Abschluss der zielgerichteten Mutagenese dar und führten zu DNA-Strängen, welche das gesamte Exon 5 sowie Teile von Intron 4 und 5 des *REEPI*-Gens enthalten (s. Abb. 7, Abschnitt 4.4.2.1, S. 24). Die zu erwartende Größe der PCR-Produkte liegt bei ca. 830bp und entspricht der Länge des zwischen Primer Intron4_f und Intron5_r liegenden DNA-Abschnitts. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse zweier sekundärer PCRs beispielhaft dargestellt. Um zu überprüfen, ob die PCRs zur zielgerichteten Mutagenese erfolgreich waren, wurde eine Positivkontrolle mit Wildtyp-DNA mitgeführt. Zusätzlich erfolgte auch hier die Negativkontrolle mit Wasser.

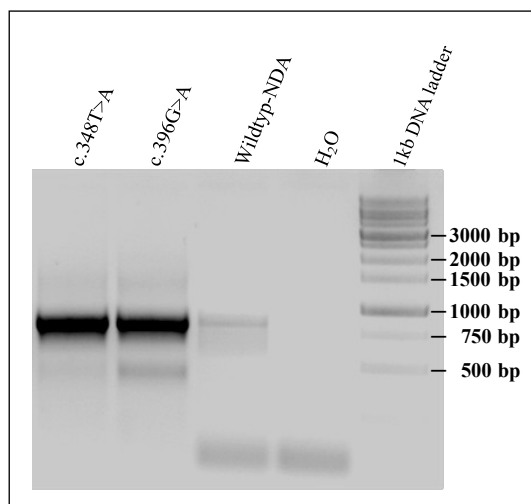


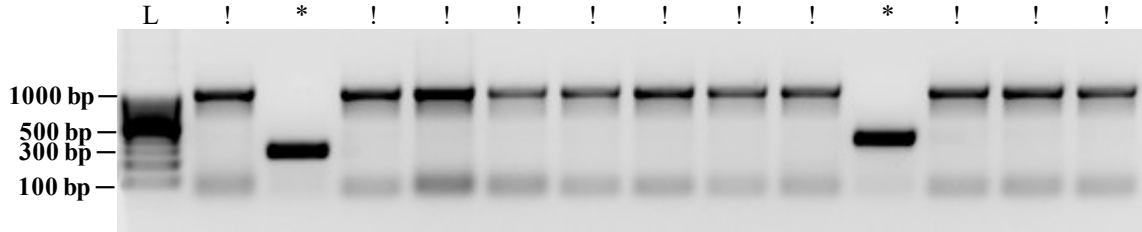
Abbildung 20 Exemplarische Ergebnisse sekundärer PCRs nach Agarose-Gelelektrophorese (1,5%)

5.4.2 Kolonie-PCR nach TOPO-TA Klonierung und Transformation von *E.coli*

Mithilfe der Kolonie-PCR konnte überprüft werden, welche Bakterienkolonien einen erfolgreich klonierten TOPO-Vektor aufgenommen haben.

Für diese Kolonie-PCR wurden die Primer M13_f und M13_r eingesetzt, deren Hybridisierungsstellen im Vektorgerüst liegen (s. Abb. 8, Abschnitt 4.4.2.2, S. 25). Im leeren TOPO-Vektor hat der DNA-Abschnitt zwischen den beiden Primer-Hybridisierungsstellen eine Länge von ca. 200bp. Bei einer Länge des Inserts von ca. 830bp ist damit nach erfolgreicher Klonierung und Transformation mit einer Gesamtgröße der PCR-Produkte von ca. 1030bp zu rechnen.

In Abbildung 21 sind exemplarisch für die Kolonie-PCRs des TOPO-Vektors die Ergebnisse von Variante c.345C>A dargestellt.



(L) 100 bp DNA ladder, (!) Kolonien mit erfolgreich kloniertem TOPO-Vektor, (*) Kolonien mit leerem TOPO-Vektor

5.4.3 DNA-Sequenzierung von erfolgreich klonierten TOPO-Vektoren

Die DNA-Sequenzierung wurde durchgeführt, um mögliche Diskrepanzen in der Nukleotid-Sequenz der Inserts zu erkennen. Zudem sollten beispielsweise die Restriktionsschnittstellen vollständig und unverändert vorliegen, da diesen eine Schlüsselrolle im anschließenden Restriktionsverdau zukommt. Mit der DNA-Sequenzierung konnte somit gezeigt werden, dass zielgerichtete Mutagenese, TOPO-TA Klonierung und Transformation in kompetente Bakterien erfolgreich waren.

Die Ergebnisse der Sequenzierung der Wildtyp-DNA im Vergleich zu einer mutierten DNA (c.320T>C) zeigt Abbildung 22 in Auszügen.

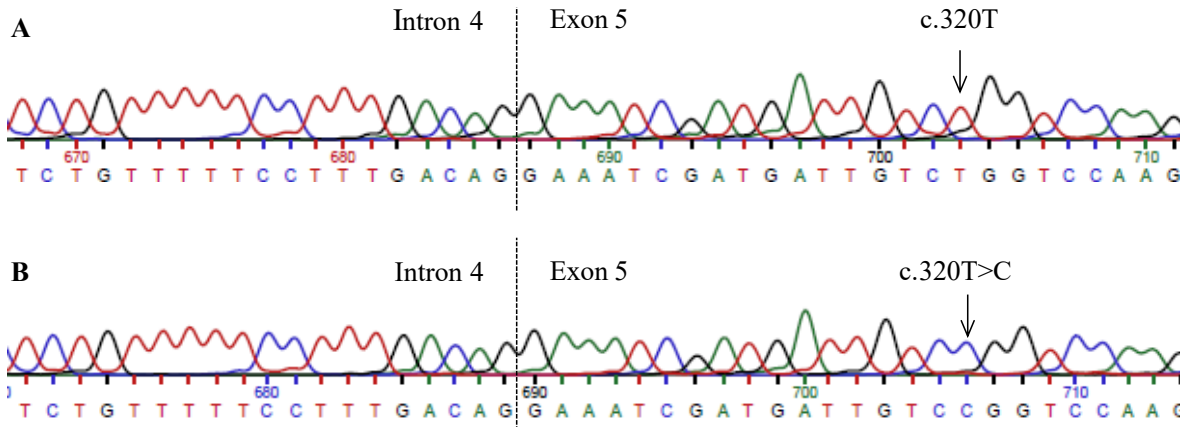


Abbildung 22 Sequenzierung der Wildtyp-DNA (A) im Vergleich zur Variante c.320T>C (B)

In Abbildung 23 ist ergänzend der Übergang vom Vektorgerüst zum Insert dargestellt. Am Anfang des Inserts befindet sich die Sequenz des Primers Intron4_f sowie die darin enthaltene Restriktionsschnittstelle *EcoRI*.

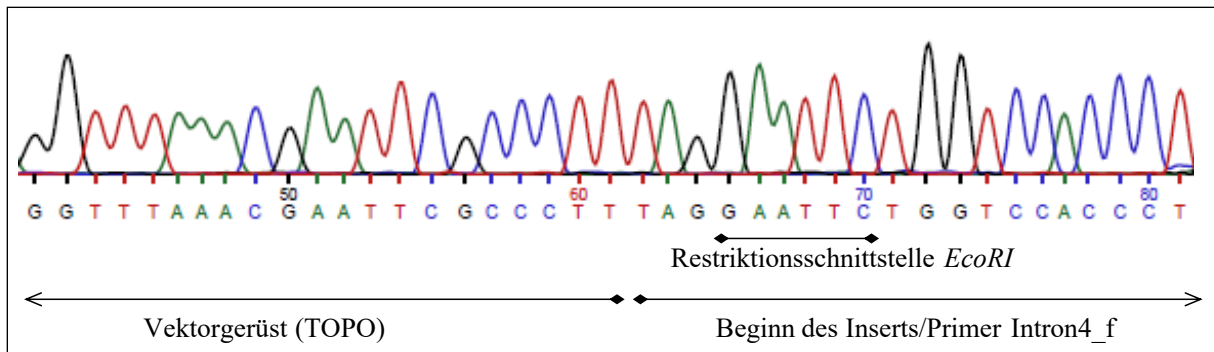


Abbildung 23 DNA-Sequenzierung des Übergangs vom TOPO-Vektorgerüst zum Insert (Sequenz des Primers Intron 4_f mit der Restriktionsschnittstelle *EcoRI*)

5.4.4 Restriktionsverdau zur Umklonierung der Inserts in den pSPL3-Vektor

In Vorbereitung auf die weiteren Arbeitsschritte war es notwendig, die Inserts aus dem TOPO-Vektor auszuschneiden und in den pSPL3-Vektor zu klonieren. Aufgrund der Vektoreigenschaften und der vorhandenen Restriktionsschnittstellen konnte dies durch die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *PstI* umgesetzt werden (s. Abschnitt 4.3.2, S. 17 sowie Abb. 11, Abschnitt 4.4.4.6, S. 30). Der leere TOPO-Vektor hat eine Größe von ca. 4kb, der leere pSPL3-Vektor von ca. 6kb. Wie bereits in den vorherigen Abschnitten erwähnt, haben die Inserts eine Länge von ca. 830bp. Abbildung 24 zeigt den Restriktionsverdau des leeren pSPL3-Vektors sowie exemplarisch zweier erfolgreich klonierter TOPO-Vektoren.

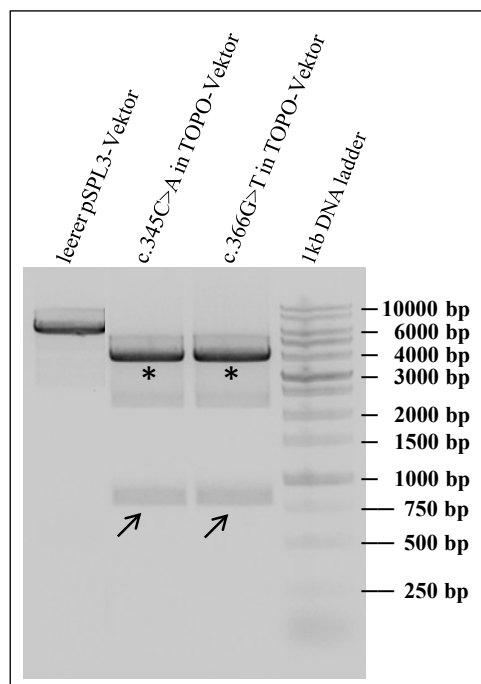


Abbildung 24 Exemplarische Ergebnisse des Restriktionsverdaus von leerem pSPL3-Vektor und kloniertem TOPO-Vektor nach Agarose-Gelelektrophorese (1%)
(*) leerer TOPO-Vektor, (↑) herausgeschnittenes Insert

5.4.5 Kolonie-PCR nach Klonierung in pSPL3-Vektor und Transformation von *E.coli*

Auch nach der Umklonierung in den pSPL3-Vektor sollte überprüft werden, welche Bakterienkolonien einen Vektor mit einem Insert aufgenommen haben.

Für den pSPL3-Vektor wurden die Primer pSPL3_f und Intron5_r verwendet (s. Abb. 8, Abschnitt 4.4.2.2, S. 25). Die Länge der DNA-Sequenz zwischen dem Primer pSPL3_f und der multiplen Klonierungsstelle, in welcher die Restriktionsschnittstellen liegen, beträgt ca. 360bp. Hinzu kommt die Länge der Inserts mit ca. 830bp, sodass die erwartete Größe der PCR-Produkte bei ca. 1190bp liegt. Die Ergebnisse der Kolonie-PCR der Variante c.337C>T sind als Beispiel in Abbildung 25 dargestellt.

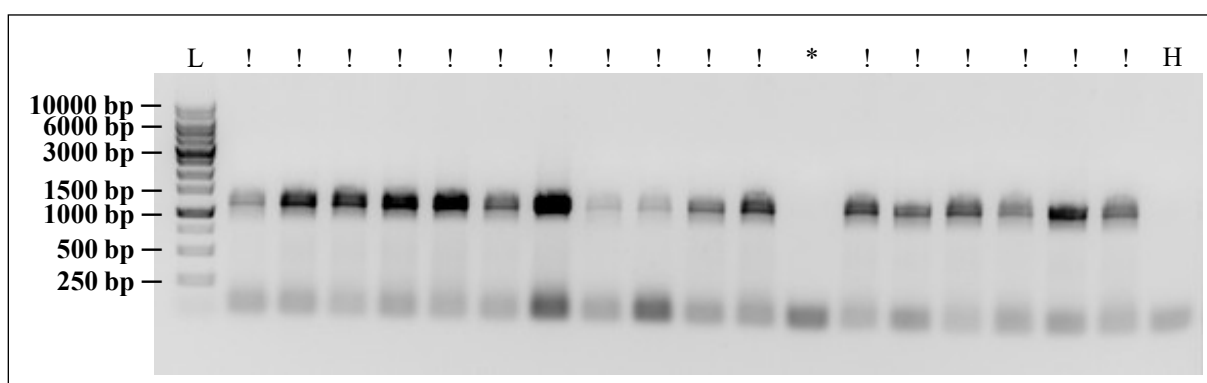


Abbildung 25 Ergebnis der Kolonie-PCR (pSPL3-Vektor) nach Agarose-Gelelektrophorese (1%) am Beispiel der Variante c.337C>T
(L) 1 kb DNA ladder, (!) Kolonien mit erfolgreich kloniertem pSPL3-Vektor, (*) Kolonien mit leerem pSPL3-Vektor, (H) Negativkontrolle mit Wasser

5.4.6 DNA-Sequenzierung von erfolgreich klonierten pSPL3-Vektoren

Genau wie nach der Klonierung der Inserts in den TOPO-Vektor (s. Abschnitt 5.4.3, S. 47), erfolgte nach der Umklonierung in den pSPL3-Vektor eine DNA-Sequenzierung. Auch im Falle des pSPL3-Vektors war damit gleichzeitig die Überprüfung der vorangegangenen Arbeitsschritte möglich. Abbildung 26 zeigt die DNA-Sequenzierung des Übergangs vom pSPL3-Vektorgerüst zum Insert mit der Restriktionsschnittstelle *EcoRI* und der Sequenz des Primers Intron4_f.

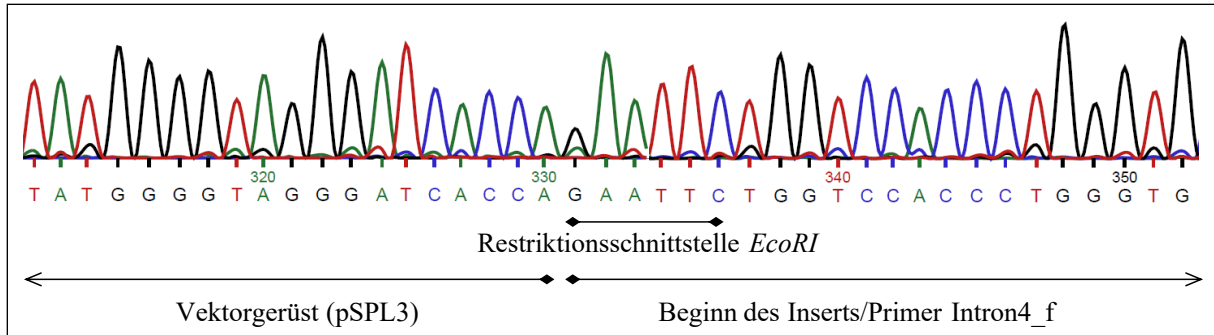


Abbildung 26 DNA-Sequenzierung des Übergangs vom pSPL3-Vektorgerüst zum Insert (Sequenz des Primers Intron 4_f mit der Restriktionsschnittstelle *EcoRI*)

5.5 Auswirkungen der *REEP1*-Varianten auf das Spleißen der prä-mRNA

Im Anschluss an die erfolgreiche Klonierung der Inserts in den pSPL3-Vektor wurde dieser in *HeLa*-Zellen transfiziert. Aus diesen konnte schließlich die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben werden. Anhand der cDNA-PCR konnten die Auswirkungen der unterschiedlichen *REEP1*-Varianten auf das Spleißen der prä-mRNA dargestellt werden.

Die Länge der DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern (pSPL3_f und pSPL3_r) beträgt ca. 200bp. Dies entspricht gleichzeitig der zu erwartenden Größe des PCR-Produkts eines leeren pSPL3-Vektors. Das Exon 5 des *REEP1*-Gens hat eine Länge von 114bp, sodass für das PCR-Produkt des Wildtyps und der Varianten ohne Spleißeffekt eine Länge von ca. 314bp zu erwarten ist. Für fehlende Spleißeffekte sowie weitere mögliche Spleißeffekte der Varianten sei auch auf Abb. 5, Abschnitt 4.3.2, S. 19 und Abb. 7, Abschnitt 4.4.2.3, S. 26 verwiesen.

Die Abbildungen 27 und 28 zeigen die Ergebnisse der cDNA-PCRs und damit die Auswirkungen der im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Varianten aus dem Exon 5 des *REEP1*-Gens auf das Spleißen von prä-mRNA.

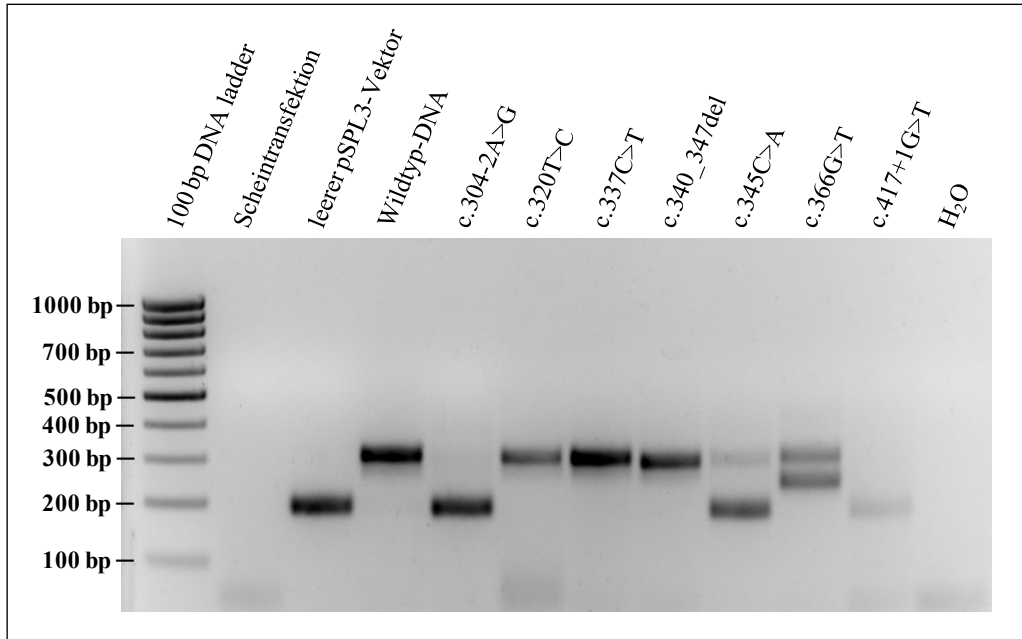


Abbildung 27 Ergebnisse der cDNA-PCRs aller *REEPI*-Varianten, die ausschließlich in der Literatur beschrieben worden sind

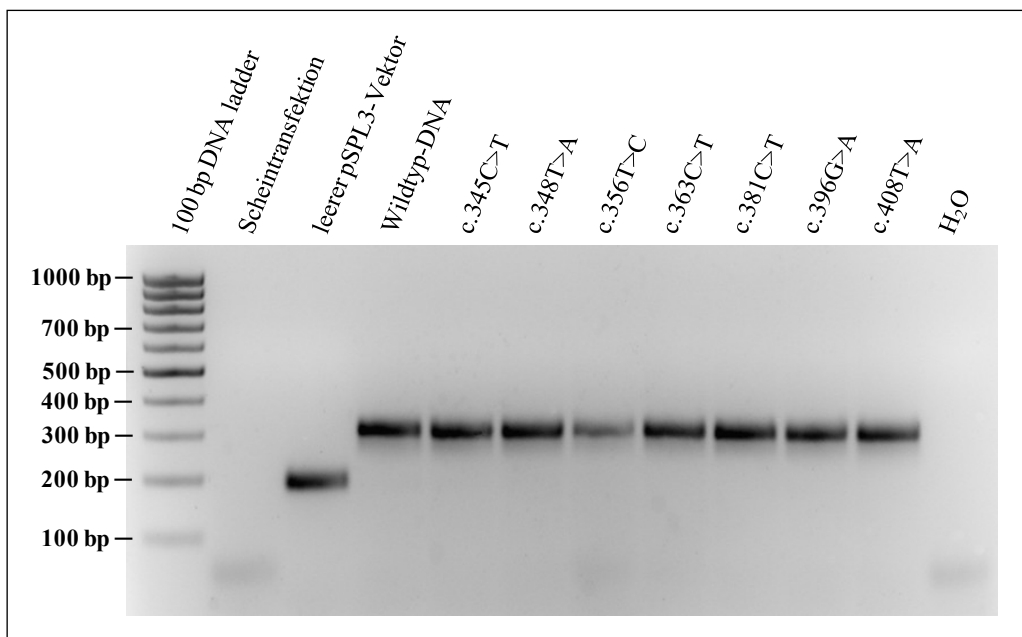


Abbildung 28 Ergebnisse der cDNA-PCRs aller *REEPI*-Varianten aus den Datenbanken

Anhand der PCR-Ergebnisse ergibt sich kein Hinweis auf Spleißeffekte für die folgenden *REEPI*-Varianten: c.320T>C, c.337C>T, c.340_347delAGTTACGA, c.345C>T, c.348T>A, c.356T>C, c.363C>T, c.381C>T, c.396G>A und c.408T>A. Die Länge der PCR-Produkte entspricht der des Wildtyps.

Die weiteren Varianten gehen dagegen mit Änderungen im Spleißen der prä-mRNA einher.

Das PCR-Produkt der Variante c.304-2A>G hat die gleiche Länge (ca. 200bp) wie das des leeren pSPL3-Vektors. Somit geht die als Spleiß-Mutation beschriebene Variante mit einem kompletten Verlust des Exons 5 einher. Die Ergebnisse sowie die Auswirkungen auf das Spleißen zeigt Abbildung 29.

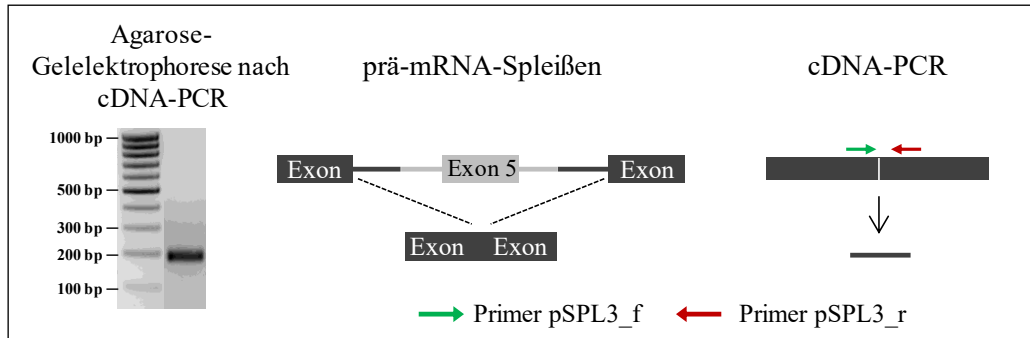


Abbildung 29 Auswirkungen der Variante c.304-2A>G auf das Spleißen von prä-mRNA

Für die Variante c.345C>A zeigen sich nach der Agarose-Gelelektrophorese zwei PCR-Produkte unterschiedlicher Länge (Abbildung 30). Die Größe der kürzeren, stärkeren Bande entspricht der des leeren pSPL3-Vektors. Die längere, schwache Bande hat die gleiche Größe wie das PCR-Produkt der Wildtyp-Sequenz.

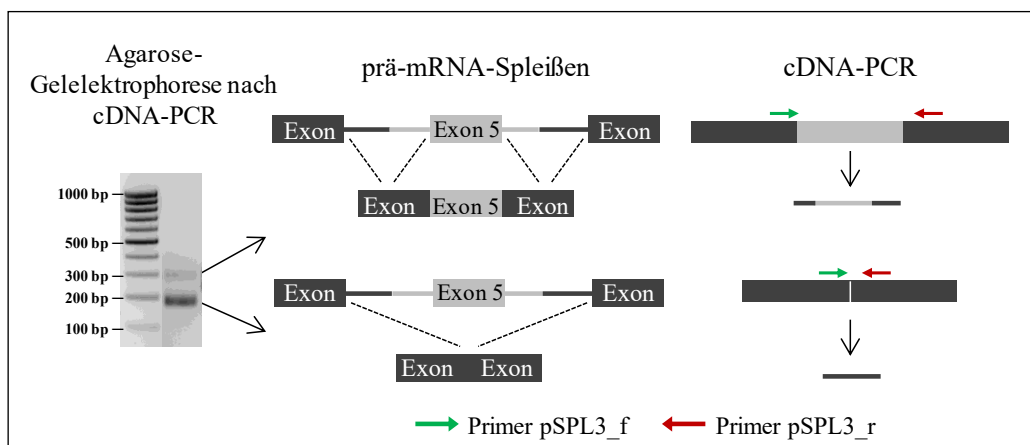


Abbildung 30 Auswirkungen der Variante c.345C>A auf das Spleißen von prä-mRNA

Auch die Variante c.366G>T hat Effekte auf das prä-mRNA-Spleißen und die cDNA-PCR führt zu zwei Produkten unterschiedlicher Länge. Dabei entspricht die Größe der oberen Bande der des PCR-Produkts des Wildtyps. Die Länge der kürzeren Bande liegt zwischen denen der PCR-Produkte von Wildtyp und leerem pSPL3-Vektor. Ein unvollständiger Verlust des Exons 5 ist anzunehmen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 ausführlich dargestellt.

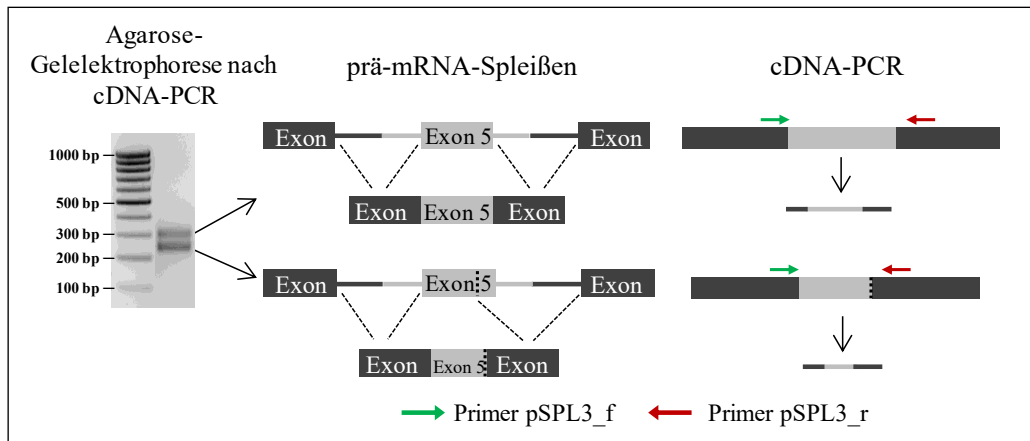


Abbildung 31 Auswirkungen der Variante c.366G>T auf das Spleißen von prä-mRNA

Die Ergebnisse für die Variante c.417+1G>T entsprechen denen der Variante c.304-2A>G. Auch diese Variante wurde als Spleiß-Mutation beschrieben und das PCR-Produkt entspricht dem des leeren pSPL3-Vektors. Somit geht auch diese Variante mit einem vollständigen Verlust des Exons 5 einher (Abbildung 32).

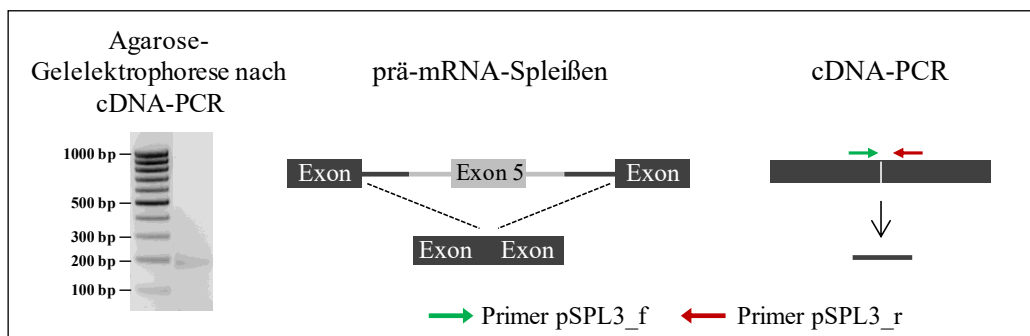


Abbildung 32 Auswirkungen der Variante c.417+1G>T auf das Spleißen von prä-mRNA

6. Diskussion

6.1 *In-silico*-Analysen zur Vorhersage von möglichen Spleißeffekten

6.1.1 Vorhersage von potentiellen Spleißstellen

Die Analyse möglicher Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen durch Human Splicing Finder und Fruit Fly Splice Site Predictor ergibt im Wesentlichen übereinstimmende Ergebnisse. Beide Programme sagen für die Variante c.304-2A>G den Verlust des Wildtyp-Akzeptors, für Variante c.366G>T die Entstehung einer neuen, starken Spleißdonorstelle und für die Variante c.417+1G>T den Verlust des Wildtyp-Donors voraus.

Während der Fruit Fly Splice Site Predictor offensichtlich nur die tatsächlichen Spleißstellen (Wildtyp-Donor und Wildtyp-Akzeptor) bzw. besonders starke Spleißstellen angibt, werden vom Human Splicing Finder alle Spleißstellen oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes angegeben. Damit lässt sich auch erklären, dass der Human Splicing Finder für die Variante c.417+1G>T neben dem Verlust des Wildtyp-Donors die Entstehung einer neuen Spleißdonorstelle angibt, die allerdings schwächer als der ursprüngliche Wildtyp-Donor ist. Letzteres ist der Grund dafür, dass diese neue Spleißdonorstelle vom Fruit Fly Splice Site Predictor nicht angegeben wird. Auch für einige der weiteren Varianten (c.320T>C, c.363C>T, c.396G>A, c.408T>A) gibt der Human Splicing Finder leicht veränderte Stärken diverser Spleißstellen an. Beim Fruit Fly Splice Site Predictor wird nur für die Variante c.320T>C eine minimale Änderung angegeben. Es handelt sich hierbei allerdings um den Wildtyp-Akzeptor und keine zusätzliche Spleißstelle.

Unter Einbeziehung der Ergebnisse des prä-mRNA-Spleißens im Rahmen dieser Dissertation zeigt sich, dass sowohl der Human Splicing Finder als auch der Fruit Fly Splice Site Predictor für die Vorhersage von Spleißstellen durchaus geeignet sind. Entsprechend der Analysen gehen die Varianten c.304-2A>G und c.417+1G>T mit einem Verlust des Exons 5 einher. Das ist vereinbar mit den Voraussagen hinsichtlich des Verlustes von Wildtyp-Akzeptor bzw. Wildtyp-Donor. Auch für die Variante c.366G>T passen die Ergebnisse überwiegend zu den Vorhersagen. Die neu entstandene Spleißdonorstelle führt zu einem partiellen Verlust von Exon 5. An diesem Beispiel zeigt sich aber auch, dass die Vorhersageprogramme keine Aussagen dazu treffen können, ob die vorausgesagte Änderung jeden Spleißvorgang betrifft. Für Variante c.366G>T zeigen die experimentellen Untersuchungen zwei Spleißprodukte. Dies geht in der Form nicht aus den *in-silico*-Analysen hervor.

Bezüglich der Variante c.345C>A haben beide Programme keine Änderungen an den Spleißstellen vorhergesagt. Allerdings haben die Untersuchungen gezeigt, dass es wie für Variante c.366G>T zu einem Spleißeffekt mit zwei unterschiedlichen Spleißprodukten kommt. Die für das korrekte Spleißen erforderlichen Abläufe sind sehr komplex und die Spleißstellen nicht allein ausschlaggebend. Es ist daher wahrscheinlich, dass bei der Variante c.345C>A andere Komponenten ursächlich für das veränderte Spleißen sind.

Alle weiteren Varianten, für die von den beiden Programmen keine Änderungen in den Spleißstellen vorausgesagt wurden, zeigen auch in den experimentellen Ergebnissen normale Spleißprodukte.

6.1.2 Vorhersage von potentiellen exonischen Spleißverstärkern

Die *in-silico*-Analysen hinsichtlich der ESEs durch ESEfinder und RESCUE-ESE Web Server führen zu sehr viel umfangreicheren Ergebnissen. Beide Programme sagen für den Wildtyp mehrere ESEs (27 [ESEfinder] zu 11 [RESCUE-ESE Web Server]) voraus. Da der ESEfinder auch den Score eines potentiellen ESE berechnet, liefern die Analysen dieses Programms auch die komplexeren Ergebnisse.

Aufgrund der unterschiedlichen Auswertungsmöglichkeiten der beiden Programme gibt es nur wenige Übereinstimmungen. Auf diese soll im Folgenden eingegangen werden. Auffällig ist auch, dass der ESEfinder viele ESEs im hinteren Drittel von Exon 5 erkennt, während der RESCUE-ESE Web Server nahezu ausschließlich ESEs im ersten Drittel des Exons ermittelt (s. Abb. 17, Abschnitt 5.3.3, S. 42 und Abb. 18, Abschnitt 5.3.4, S. 43). Je nach Lokalisation der zu untersuchenden Variante resultiert daraus eine entsprechende Anzahl prognostizierter Veränderungen.

Für die Variante c.304-2A>G zeigen beide Programme als Gemeinsamkeit den Verlust zweier ESEs. Zusammen mit dem prognostizierten Verlust des Wildtyp-Akzeptors (s. Abschnitt 6.1.1, S. 54) kann hierin eine mögliche Ursache für das in den experimentellen Untersuchungen gezeigte Herausspleißen von Exon 5 liegen. Für die Variante c.337C>T ermittelt der ESEfinder einen neu entstandenen sowie einen verloren gegangenen ESE. Der RESCUE-ESE Web Server gibt die Entstehung von vier neuen ESEs an. Offensichtlich sind diese Änderungen aber irrelevant für die Modifikation der mRNA, da es in der experimentellen Untersuchung nicht zu einem veränderten Spleißen kommt. Übereinstimmungen hinsichtlich des Verlustes oder Zugewinns von ESEs gibt es zwischen beiden Programmen darüber hinaus nur für die Varianten c.340_347del und c.381C>T. Beide

Varianten führen nicht zur Neuentstehung von ESEs und stimmen somit mit den experimentellen Ergebnissen (kein Spleißeffekt) überein.

Einzeln betrachtet, zeigt der ESEfinder für die Variante c.366G>T einen neu entstandenen ESE. Dieser kann zusätzlich zur vorausgesagten neu entstandenen Spleißdonorstelle (s. Abschnitt 6.1.1, S. 54) ursächlich für das partiell veränderte Spleißen der Variante sein. Die weiteren Varianten (c.320C>T, c.356T>C, c.408T>A, c.417+1G>T), die mit der Entstehung von neuen ESEs einhergehen (für Variante c.356T>C zum Teil mit einem Score deutlich über dem Schwellenwert), zeigen in den experimentellen Untersuchungen allerdings keine Veränderungen in der mRNA.

Der RESCUE-ESE Web Server prognostiziert für die Variante c.345C>A zwei neue ESEs. Da sich hier in den experimentellen Untersuchungen ein partiell verändertes Spleißen bei unverändert prognostizierten Spleißstellen zeigt, sind diese Veränderungen möglicherweise als ursächlich anzusehen. Für die Varianten c.345C>T und c.348T>A sind die berechneten neu entstehenden ESEs laut der experimentellen Ergebnisse nicht relevant für das Spleißen. Für die mit einem Spleißeffekt einhergehenden Varianten c.366G>T und c.417+1G>T sagt der RESCUE-ESE Web Server keine gegenüber dem Wildtyp veränderten ESEs voraus. Übereinstimmungen zwischen experimentellen Ergebnissen und Vorhersage von ESEs durch den RESCUE-ESE Web Server zeigen sich für die Varianten c.320C>T, c.356T>C, c.381C>T, c.396G>A und c.408T>A, die jeweils dem Wildtyp entsprechen.

6.1.3 Einsatz von *in-silico*-Analysen – ein Fazit

Während die Anwendung der Vorhersageprogramme bezüglich potentieller Spleißstellen mit klaren Ergebnissen einhergeht, führen die Vorhersagen der ESEs zu einer deutlich unübersichtlicheren Menge an Informationen.

Auch unter Berücksichtigung der experimentellen Ergebnisse sind die Programme zur Vorhersage der Spleißstellen praktikabler und aussagekräftiger, wenngleich ihre Möglichkeiten begrenzt sind und nicht alle Veränderungen (z.B. c.345C>A) richtig vorausgesagt werden. Es ist außerdem zu erwähnen, dass diese Programme mitunter nicht zwischen echten und scheinbaren Spleißstellen unterscheiden können (Baralle und Baralle 2005). Zu experimentellen Untersuchungen von Mutationen stellen die hier eingesetzten Programme (Human Splicing Finder und Fruit Fly Splice Site Predictor) aber eine sinnvolle Ergänzung dar.

Die Ergebnisse zur Vorhersage von ESEs deuten darauf hin, dass ihre Erkennung und Einschätzung deutlich komplexer als die Erkennung potentieller Spleißstellen ist. Dafür

sprechen auch die für viele Varianten unterschiedlichen Ergebnisse. Es muss weiterhin berücksichtigt werden, dass der ESEfinder und der RESCUE-ESE Web Server verschiedene Parameter zur Ermittlung der ESEs verwenden. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass der ESEfinder nur Sequenzen analysiert, die von vier bestimmten SR-Proteinen erkannt werden und weitere SR-Proteine sowie Nicht-SR-Proteine nicht berücksichtigt (Baralle und Baralle 2005). Auch die Tatsache, dass es neben ESEs noch ESS, ISE und ISS gibt, die ebenfalls Einfluss auf die Erkennung von Spleißstellen nehmen, zeigt, wie komplex und schwierig das Zusammenspiel aller Komponenten hinsichtlich des korrekten Spleißens ist (Baralle und Baralle 2005).

Insgesamt sollte bei der Nutzung dieser Programme beachtet werden, dass es sich um bioinformatische Anwendungen handelt, die ständig weiterentwickelt und verbessert werden. Sie können von den Ergebnissen experimenteller Untersuchungen profitieren und somit „lernen“. Ein alleiniger Einsatz zur Vorhersage von Spleißeffekten ist daher kritisch zu sehen und sollte möglichst vermieden werden.

6.2 Minigen-Systeme zur Untersuchung von Spleißeffekten

Unter Einsatz von Minigen-Systemen ist es möglich, Mutationen hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf das prä-mRNA-Spleißen zu untersuchen, auch wenn kein Material aus dem betroffenen Gewebe des Patienten vorliegt bzw. wenn - wie im Fall von *REEPI* - keine Expression im peripheren Blut erfolgt (Gaildrat et al. 2010). Ein weiterer Vorteil dieser Systeme besteht darin, dass nur kurze DNA-Fragmente, v.a. bezogen auf die intronischen Bereiche, benötigt werden (Baralle und Baralle 2005). Mithilfe von Minigen-Systemen kann ganz gezielt die Auswirkung einer bestimmten Mutation auf den Spleißvorgang untersucht werden (Cooper 2005). Zudem ist immer auch ein direkter Vergleich zwischen Mutation und Wildtyp unter den gleichen Voraussetzungen möglich (Gaildrat et al. 2010).

Dennoch ist die Aussagefähigkeit von Minigen-Systemen limitiert. Es ist nicht auszuschließen, dass prä-mRNA unter den Bedingungen eines Minigen-Systems in anderer Form gespleißt wird als im entsprechenden Organismus. Das kann zum Beispiel dadurch bedingt sein, dass bestimmte gen- oder organismusspezifische Komponenten oder Sequenzen nicht Teil des Minigen-Konstruktes sind. Es ist bekannt, dass es auch zwischen verschiedenen Geweben eines Organismus zur unterschiedlichen Expression von prä-mRNA kommen kann. Somit wäre auch im Falle einer Untersuchung von mRNA aus dem Blut eines Patienten nicht garantiert, dass diese der mRNA im betroffenen Gewebe entspricht. (Cooper 2005, Gaildrat et al. 2010)

6.3 Einordnung der Ergebnisse vor dem Hintergrund der klinischen Daten

6.3.1 Varianten aus den Datenbanken

Die im Rahmen der Datenbankrecherche gefundenen Varianten c.345C>T, c.348T>A, c.356T>C, c.363C>T, c.381C>T, c.396G>A und c.408T>A sind als SNPs eingestuft und treten in der Bevölkerung mit unterschiedlichen Allelfrequenzen auf (s. Tab. 8, Abschnitt 5.2, S. 36). Die Varianten c.348T>A und c.356T>C sind Missense-Mutationen. Bei allen anderen handelt es sich um stille Mutationen.

Zu keiner der genannten Varianten liegen nähere Angaben zu den phänotypischen Ausprägungen bei den Anlageträgern vor. Lediglich von den stillen Mutationen c.381C>T und c.408T>A ist bekannt, dass sie auch in einer Gruppe von Patienten mit reiner oder komplizierter HSP gefunden wurden (Beetz et al. 2008). Welche genaue klinische Ausprägung bei den Trägern dieser beiden Varianten vorliegt, ist nicht berichtet. Die Variante c.408T>A liegt laut den Autoren in einem konservierten Bereich. Da es sich in beiden Fällen jedoch um stille und in den Datenbanken gelistete Varianten handelt, sind sie sehr wahrscheinlich als nicht krankheitsverursachend einzustufen.

Die Untersuchungen mithilfe des Minigen-Systems haben für alle genannten Varianten keine Änderungen im prä-mRNA-Spleißen im Vergleich zum Wildtyp gezeigt. Die Ergebnisse unterstützen damit die Einschätzung, dass es sich um nicht-pathogene Varianten handelt.

6.3.2 Variante c.304-2A>G

Bei dieser Variante handelt es sich um die von Beetz et al. 2012 in Patienten mit dHMN V beschriebene Veränderung. Da die Erkenntnisse aus der dazugehörigen Studie die Grundlage für diese Dissertation sind, wurde die Variante c.304-2A>G ebenfalls untersucht und kann gleichsam als Positiv-Kontrolle angesehen werden.

Die Variante c.304-2A>G ist die bislang einzige Veränderung im *REEPI*-Gen, die mit dem klinischen Bild einer dHMN V einhergeht. Vier Mitglieder der untersuchten Familie zeigen Symptome der Erkrankung. Zu den wesentlichen Merkmalen gehören der Erkrankungsbeginn vor dem 20. Lebensjahr sowie bei zwei Betroffenen der Beginn der Motoneuropathie in der Handmuskulatur. Letztere beschränkt sich ausschließlich auf Thenarmuskulatur und Mm. interossei dorsales I. Bei drei der vier Betroffenen zeigt sich außerdem eine Beteiligung der unteren Extremitäten mit Gangstörung und Fußdeformität (Pes cavus). Die Pyramidenbahnzeichen waren bei allen Patienten negativ.

Die experimentellen Untersuchungen konnten die von den *in-silico*-Analysen vorausgesagten Veränderungen bezüglich des Spleißens der prä-mRNA bestätigen. Die Mutation im Wildtyp-Akzeptor führt zum vollständigen Verlust von Exon 5.

6.3.3 Variante c.320T>C und c.340_347delAGTTACGA

Die Missense-Mutation c.320T>C und die acht Basen umfassende Deletion c.340_347delAGTTACGA wurden in einer Kohorte von Patienten mit familiärer, reiner HSP gefunden (Schlang et al. 2008). Leider gibt es für keinen der Betroffenen nähere Angaben zur klinischen Ausprägung der Erkrankung. Für die Deletion c.340_347del wird von den Autoren eine Verschiebung des Leserasters mit Einbau eines vorzeitigen Stopcodons vorausgesagt.

Die experimentellen Untersuchungen zeigen für keine der beiden Varianten eine Auswirkung auf das Spleißen der prä-mRNA. Ein Spleißeffekt, der das Exon 5 des *REEPI*-Gens betrifft, ist damit für diese beiden Mutationen sehr wahrscheinlich nicht krankheitsverursachend.

6.3.4 Variante c.337C>T

Bei der Nonsense-Mutation c.337C>T handelt es sich um eine familiäre Variante, die mit einer komplizierten HSP einhergeht (Hewamadduma et al. 2009). Die Betroffenen sind zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr erkrankt und wurden aufgrund von Fußdeformitäten (Pes cavus) und einer schweren Gangstörung zwischen dem 30. und 35. Lebensjahr rollstuhlpflichtig. Zudem zeigen alle eine ausgeprägte Amyotrophie. Zu den weiteren klinischen Symptomen gehören ein erhöhter Muskeltonus sowie lebhaft Reflexe in allen vier Extremitäten und ein herabgesetztes Vibrationsempfinden in den distalen Bereichen der Beine.

Die Autoren haben den Einbau eines vorzeitigen Stopcodons und eine damit verbundene Verkürzung des Proteins vorhergesagt. In einer anderen Studie (Park et al. 2010) konnte ergänzend gezeigt werden, dass die beiden hydrophoben Transmembrandomänen im entstehenden Protein intakt sind. Anhand der Expression des veränderten Proteins in der Zelle konnten Park et al. allerdings zeigen, dass aufgrund der Mutation c.337C>T eine Interaktion mit den Mikrotubuli nicht mehr möglich ist.

Für die Variante c.337C>T zeigen die experimentellen Ergebnisse keine Auswirkungen auf das Spleißen von Exon 5. Es ergibt sich damit kein Zusammenhang zwischen verändertem prä-mRNA-Spleißen und den phänotypischen Auffälligkeiten der Patienten.

6.3.5 Variante c.345C>A

In einer Kohorte von Patienten mit familiärer, reiner HSP wurde die Nonsense-Mutation c.345C>A beschrieben, die zum Einbau eines vorzeitigen Stopcodons führt (Schlang et al. 2008). Es liegen hier leider keine weiteren Daten zur phänotypischen Ausprägung bei den Betroffenen vor.

In den experimentellen Untersuchungen zeigt sich, dass die Mutation zur Entstehung zweier verschiedener mRNAs führt. Ein Spleißprodukt entspricht dem des Wildtyps während das zweite Spleißprodukt dem des leeren Vektors und damit dem kompletten Verlust des Exons 5 entspricht. Leider ist aufgrund der fehlenden klinischen Daten keine Interpretation der Ergebnisse mit möglicher Erklärung der phänotypischen Merkmale möglich. Dass die Mutation in Patienten mit reiner HSP gefunden wurde, macht das Vorliegen von Auffälligkeiten an den Händen ähnlich denen bei dHMN V zwar unwahrscheinlich, schließt diese aber auch nicht sicher aus.

6.3.6 Variante c.366G>T

Bei der Variante c.366G>T handelt es sich - ausgehend von der DNA-Sequenz - um eine stille Mutation, die in einer Gruppe von Patienten mit reiner oder komplizierter HSP gefunden wurde (Goizet et al. 2011).

Die Variante wurde bei mehreren Betroffenen in einer Familie nachgewiesen und geht klinisch mit einer komplizierten HSP einher. Zwei der Patienten sind bereits im Alter von 1 bzw. 5 Jahren erkrankt, während ein dritter Betroffener erst im Alter von 78 Jahren erkrankt ist. Für diesen Patienten muss ergänzt werden, dass er zusätzlich an den Folgen einer schweren Lyme-Borreliose leidet. Ein vierter Patient war zum Zeitpunkt der Untersuchung im Alter von 43 Jahren noch asymptomatisch. Einzig eine Skoliose sowie eine Fußdeformität (Pes cavus) sind bei ihm beschrieben.

Bei den drei bereits erkrankten Familienmitgliedern zeigen sich Symptome mit unterschiedlichem Ausprägungsgrad. Dazu gehören unter anderem eine Spastik der unteren Extremität, gesteigerte Reflexe, ein positives Babinskizeichen, ein reduziertes Vibrationsempfinden sowie Pes cavus oder Skoliose. Bei dem im Alter von 78 Jahren Erkrankten liegen außerdem eine Atrophie der Beinmuskulatur, eine Blasenfunktionsstörung sowie weitere Symptome (Demenz, Dysphagie, Depression und aggressives Verhalten) vor.

Der Sohn dieses Patienten zeigt interessanterweise Anzeichen eines Silver-Syndroms (Atrophie der Handmuskulatur sowie Spastik und gesteigerte Reflexe im Bereich der oberen Extremitäten).

Goizet et al. berichten, dass die *in-silico*-Analysen die Entstehung einer neuen Spleißdonorstelle voraussagen und es dadurch zum Verlust eines 53 bp langen Fragmentes kommt. Zur Bestätigung wurde mRNA aus lymphblastoiden Zellen eines Patienten extrahiert und sequenziert. Es zeigte sich, dass das Fehlen des Exon 5-Fragmentes zu einem vorzeitigen Stopcodon im Exon 6 führt.

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass es zur Entstehung zweier unterschiedlich langer mRNAs kommt. Eine entspricht der mRNA des Wildtyps und geht ohne Verlust des Exons 5 einher. Das zweite Spleißprodukt ist kleiner als das des Wildtyps, aber größer als bei einem kompletten Verlust von Exon 5. Es muss somit von einem partiellen Verlust von Exon 5 ausgegangen werden. Die von den Autoren beschriebene Auswirkung auf das Exon 6 kann mit der im Rahmen dieser Dissertation gewählten Versuchsanordnung (ausschließliche Analyse des Exons 5) nicht untersucht werden.

Goizet et al. haben die Symptome im Bereich der oberen Extremität als Silver-Syndrom-ähnlich beschrieben. Gleichzeitig könnte hierin aber auch eine phänotypische Überschneidung zur dHMN V gesehen werden, die durch eine vollständige Deletion des Exons 5 verursacht wird.

6.3.7 Variante c.417+1G>T

Die Variante c.417+1G>T wurde zunächst in einer Kohorte von Patienten mit reiner oder komplizierter HSP nachgewiesen (Beetz et al. 2008). Auch in einer weiteren Studie wurde sie in Patienten mit autosomal-dominant vererbter HSP gefunden (de Bot et al. 2013). Insgesamt gibt es aus beiden Studien klinische Daten zu drei verschiedenen Familien.

Es handelt sich um eine familiäre Variante, die mit einer reinen Form von HSP einhergeht. Das Erkrankungsalter liegt vor dem 20. Lebensjahr oder nach dem 30. Lebensjahr. Auch innerhalb einer Familie zeigt sich diesbezüglich eine Variabilität. Der Ausprägungsgrad wird von mild bis schwer angegeben und zu den klinischen Symptomen gehören Spastik und Hyperreflexie sowie Muskelschwäche und -atrophie im Bereich der unteren Extremitäten, reduziertes Vibrationsempfinden, Blasenfunktionsstörungen und Fußdeformität (Pes cavus). Eine Patientin zeigt außerdem eine Hyperreflexie der Arme und ein Restless-Legs-Syndrom. Die Autoren stufen die vorliegende Form dennoch als reine HSP ein (de Bot et al. 2013).

Bei der Variante c.417+1G>T handelt es sich um eine Spleiß-Mutation im Bereich des Wildtyp-Donors von Intron 5 und es wird auf Proteinebene eine Verschiebung des Leserasters vorhergesagt.

Die experimentellen Untersuchungen zeigen den kompletten Verlust des Exons 5 in der mRNA. Bezüglich der Auswirkungen der Variante auf die weiteren Exons des *REEPI*-Gens ist im Rahmen dieser Dissertation keine Aussage möglich. Phänotypisch zeigt sich bei den Trägern dieser Variante keine Beteiligung der Handmuskulatur.

6.4 Korrelieren Veränderungen im prä-mRNA-Spleißen mit einem speziellen Phänotyp?

Im Rahmen dieser Dissertation sollte u.a. untersucht werden, ob es aufgrund von Veränderungen im prä-mRNA-Spleißen von Exon 5 des *REEPI*-Gens zur Ausprägung phänotypischer Merkmale der dHMN V (v.a. Veränderungen der Handmuskulatur, s. Abschnitt 6.3.2, S. 58) bei Patienten mit HSP kommt.

Die aus den Datenbankenrecherchen stammenden Varianten c.345C>T, c.348T>A, c.356T>C, c.363C>T, c.381C>T, c.396G>A und c.408T>A, die als SNPs eingestuft sind, gehen nicht mit Veränderungen im prä-mRNA-Spleißen einher.

Zur phänotypischen Ausprägung der Varianten c.320T>C und c.340_347delAGTTACGA ist nur bekannt, dass sie in Patienten mit reiner HSP gefunden wurden (Schlang et al. 2008). Da die reine HSP nicht mit einer Atrophie der Handmuskulatur einhergeht, ist davon auszugehen, dass sie auch bei den Trägern der beiden Varianten nicht vorliegt. Die in einer Familie mit komplizierter HSP gefundene Variante c.337C>T geht ebenfalls nicht mit einer Beteiligung der Handmuskulatur einher (Hewamadduma et al. 2009). Passend dazu zeigen die experimentellen Ergebnisse aller drei Varianten, dass diese nicht zu einer Veränderung des prä-mRNA-Spleißens führen.

Es lässt sich somit zusammenfassen, dass Träger von Varianten, die keine Auswirkungen auf das Spleißen der prä-mRNA haben, auch keine phänotypischen Merkmale einer dHMN V zeigen.

Die Variante c.345C>A führt teilweise zum Verlust des Exons 5. Zusätzlich entsteht aber auch ein unverändertes Spleißprodukt. Wie die Varianten c.320T>C und c.340_347delAGTTACGA wurde diese Variante in Patienten mit reiner HSP gefunden (Schlang et al. 2008) und es ist daher unwahrscheinlich, dass sich bei den Betroffenen eine Beteiligung der Handmuskulatur zeigt. Weitere klinische Daten liegen leider auch hier nicht vor.

Ähnlich wie für Variante c.345C>A verhält es sich bei der Spleiß-Mutation c.417+1G>T, die zu einem vollständigen Verlust des Exons 5 führt. Diese Variante wurde ebenfalls als krankheitsverursachend für eine reine HSP eingestuft und die Patienten zeigen keine, einer

dHMN V entsprechende, Beteiligung der Handmuskulatur (Beetz et al. 2008, de Bot et al. 2013).

Bei Betrachtung dieser beiden Varianten lässt sich kein Zusammenhang von Veränderungen im Spleißen des Exons 5 und Ausprägung von phänotypischen Merkmalen der dHMN V feststellen.

Anders verhält es sich für die Variante c.366G>T, die mit einer komplizierten HSP einhergeht (Goizet et al. 2011). In der betroffenen Familie liegt bei einem Patienten eine Atrophie der Handmuskulatur vor. Die Autoren haben diese und weitere Auffälligkeiten im Bereich der oberen Extremität ähnlich einem Silver-Syndrom beschrieben. Genauso könnten die Symptome aber denen einer phänotypischen Ausprägung von Merkmalen einer dHMN V entsprechen. Die experimentellen Ergebnisse zeigen sowohl eine unveränderte mRNA als auch eine veränderte mRNA mit partiellem Verlust des Exons 5.

Für diese Variante lässt sich somit ein Zusammenhang zwischen Veränderungen im Spleißen der prä-mRNA und phänotypischen Merkmalen einer dHMN V herstellen.

Insgesamt bieten die experimentellen Untersuchungen mittels Minigen-System keine eindeutige Schlussfolgerung bezüglich des Zusammenhangs zwischen prä-mRNA-Spleißen und der Ausprägung von phänotypischen Merkmalen einer dHMN V. Während die Varianten ohne Spleißeffekt und die Variante c.366G>T die These unterstützen, wird sie durch die Ergebnisse der Varianten c.345C>A und c.417+1G>T eher widerlegt.

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist allerdings zu berücksichtigen, dass es sich bei der SPG 31 bzw. den HSPs im Allgemeinen um Erkrankungen mit variablem Ausprägungsgrad handelt. So ist es möglich, dass Symptome erst im späteren Verlauf der Krankheit oder in sehr milder Form auftreten können. Darüber hinaus ist bekannt, dass es sowohl zwischen den Familien als auch innerhalb einer Familie zu unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen kommen kann. Dies lässt sich auch in der Familie, in der die Variante c.366G>T gefunden wurde, erkennen. Nur eines von drei bereits erkrankten Familienmitgliedern zeigt eine Atrophie der Handmuskulatur.

7. Schlussfolgerungen

Im Rahmen dieser Dissertation wurde aufgrund einer von Beetz et al. 2012 veröffentlichten Studie eine Gruppe von Mutationen im Exon 5 des *REEPI*-Gens untersucht. Die experimentellen Untersuchungen sowie die *in-silico*-Analysen dieser Dissertation wurden Ende des Jahres 2014 abgeschlossen.

Es wurden zunächst *in-silico*-Analysen durchgeführt, um mögliche Einflüsse der Mutationen auf potentielle Spleißstellen und exonische Spleißverstärker zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem die Analysen potentieller Spleißstellen eine gute Ergänzung zu experimentellen Untersuchungen darstellen. Die Analyse der exonischen Spleißverstärker führte dagegen zu uneinheitlichen Ergebnissen der beiden verwendeten Programme sowie zu einer schwierigen Ergebnisinterpretation. Darum sollten vor allem die Analysen von exonischen Spleißverstärkern nicht als alleinige Untersuchungsmethode zur Bestimmung von Spleißeffekten eingesetzt werden. Es ist weiterhin zu überlegen, ob in einem Studiendesign, wie es im Rahmen dieser Dissertation verwendet wurde, die Untersuchung weiterer Komponenten des Spleißens (z.B. ESS) hilfreich wäre, um eine klarere Einordnung der prognostizierten Spleißeffekte zu erreichen. Generell ist der Einsatz von *in-silico*-Analysen als sinnvolle Ergänzung zu sehen und bei kontinuierlicher Weiterentwicklung dieser Programme von einer Steigerung der praktischen Relevanz und höherer Genauigkeit der prognostizierten Ergebnisse auszugehen.

Die Untersuchungen der Mutationen im Exon 5 des *REEPI*-Gens hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf das Spleißen von prä-mRNA stellen den Kern dieser Dissertation dar. Mithilfe eines Minigen-Systems sollte überprüft werden, ob die verschiedenen Varianten mit Spleißeffekten einhergehen. Veränderungen im prä-mRNA-Spleißen konnten neben der von Beetz et al. 2012 beschriebenen Spleiß-Mutation c.304-2A>G für die Varianten c.345C>A, c.366G>T und 417+1G>T nachgewiesen werden. Für die Varianten c.345C>A und c.366G>T ließ sich sowohl ein verändertes als auch ein dem Wildtyp entsprechendes Spleißprodukt nachweisen. Dies könnte ein möglicher Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen sein. So stellt sich unter anderem die Frage nach der genauen Mengenverteilung der beiden Spleißprodukte. Darüber hinaus könnten Untersuchungen zur Proteinexpression klären, welche Mechanismen diesen Mutationen auf zellulärer Ebene zugrunde liegen. Es ließe sich damit auch untersuchen, ob die weiteren Varianten, die mit einem veränderten prä-mRNA-

Spleißen einhergehen, ebenso wie die Mutation c.304-2A>G mit einer gain-of-function-Komponente assoziiert sind und darin womöglich ein gemeinsamer Pathomechanismus dieser Varianten besteht.

Es ist zu berücksichtigen, dass die experimentellen Untersuchungen dieser Dissertation unter Anwendung eines Minigen-Systems erfolgten. Mit diesem wurden ausschließlich Spleißeffekte bezogen auf das Exon 5 des *REEPI*-Gens untersucht. Die höchste Aussagekraft hat die Untersuchung von Patienten-mRNA aus dem betroffenen Gewebe. Nur in diesem Kontext erfolgt ein ideales Zusammenspiel aller für das Spleißen notwendigen Komponenten und es ist eine Beurteilung der gesamten mRNA eines Gens möglich. Da die Untersuchung der entsprechenden mRNA oftmals nicht möglich ist, stellen Minigen-Systeme eine wichtige Alternative dar.

Die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen Veränderungen im Spleißen der prä-mRNA und phänotypischen Merkmalen der dHMN V gibt, lässt sich aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht sicher beantworten. Es gibt sowohl Varianten, die diese These unterstützen als auch Varianten, die sie widerlegen. Es muss in diesem Kontext berücksichtigt werden, dass es große Unterschiede in der klinischen Ausprägung, vor allem der HSPs, aber auch der dHMN V, innerhalb einer Familie und zwischen verschiedenen Familien gibt.

Insgesamt sind die Erkenntnisse zu den *REEPI* assoziierten Erkrankungen noch nicht ausreichend, um die Frage nach der Korrelation von Spleißen des Exons 5 und phänotypischen Merkmalen der dHMN V klären zu können. Es müssten zum einen mehr Betroffene mit den hier berücksichtigten Varianten untersucht werden. Zum anderen würden weitere Mutationen die im Exon 5 oder den benachbarten Spleißstellen liegen, das Spektrum der Geno- und Phänotypen deutlich erweitern und Rückschlüsse auf Pathomechanismen ermöglichen.

Da die SPG 31 und die dHMN V sehr seltene Erkrankungen sind, kann jede neu entdeckte Mutation das Wissen hinsichtlich der klinischen Ausprägung, aber auch der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen erweitern. Vor allem bezüglich der dHMN V gibt es aktuell nur wenige Erkenntnisse.

8. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Baralle D, Baralle M. 2005. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J Med Genet*, 42 (10):737-748.
- Baralle M, Baralle FE. 2018. The splicing code. *Biosystems*, 164:39-48.
- Battini R, Fogli A, Borghetti D, Michelucci A, Perazza S, Baldinotti F, Conidi ME, Ferreri MI, Simi P, Cioni G. 2011. Clinical and genetic findings in a series of Italian children with pure hereditary spastic paraplegia. *Eur J Neurol*, 18 (1):150-157.
- Beetz C, Pieber TR, Hertel N, Schabhuhtl M, Fischer C, Trajanoski S, Graf E, Keiner S, Kurth I, Wieland T, Varga RE, Timmerman V, Reilly MM, Strom TM, Auer-Grumbach M. 2012. Exome sequencing identifies a REEP1 mutation involved in distal hereditary motor neuropathy type V. *Am J Hum Genet*, 91 (1):139-145.
- Beetz C, Koch N, Khundadze M, Zimmer G, Nietzsche S, Hertel N, Huebner AK, Mumtaz R, Schweizer M, Dirren E, Karle KN, Irintchev A, Alvarez V, Redies C, Westermann M, Kurth I, Deufel T, Kessels MM, Qualmann B, Hubner CA. 2013. A spastic paraplegia mouse model reveals REEP1-dependent ER shaping. *J Clin Invest*, 123 (10):4273-4282.
- Beetz C, Schule R, Deconinck T, Tran-Viet KN, Zhu H, Kremer BP, Frints SG, van Zelst-Stams WA, Byrne P, Otto S, Nygren AO, Baets J, Smets K, Ceulemans B, Dan B, Nagan N, Kassubek J, Klimpe S, Klopstock T, Stolze H, Smeets HJ, Schrander-Stumpel CT, Hutchinson M, van de Warrenburg BP, Braastad C, Deufel T, Pericak-Vance M, Schols L, de Jonghe P, Zuchner S. 2008. REEP1 mutation spectrum and genotype/phenotype correlation in hereditary spastic paraplegia type 31. *Brain*, 131 (Pt 4):1078-1086.
- Blackstone C, O'Kane CJ, Reid E. 2011. Hereditary spastic paraplegias: membrane traffic and the motor pathway. *Nat Rev Neurosci*, 12 (1):31-42.
- Braschinsky M, Luus SM, Gross-Paju K, Haldre S. 2009. The prevalence of hereditary spastic paraplegia and the occurrence of SPG4 mutations in Estonia. *Neuroepidemiology*, 32 (2):89-93.
- Buckler AJ, Chang DD, Graw SL, Brook JD, Haber DA, Sharp PA, Housman DE. 1991. Exon amplification: a strategy to isolate mammalian genes based on RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (9):4005-4009.
- Burge CB, Padgett RA, Sharp PA. 1998. Evolutionary fates and origins of U12-type introns. *Mol Cell*, 2 (6):773-785.
- Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. 2003. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res*, 31 (13):3568-3571.
- Chow LT, Gelinas RE, Broker TR, Roberts RJ. 1977. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell*, 12 (1):1-8.
- Cooper TA. 2005. Use of minigene systems to dissect alternative splicing elements. *Methods*, 37 (4):331-340.
- de Bot ST, van de Warrenburg BP, Kremer HP, Willemsen MA. 2010. Child neurology: hereditary spastic paraplegia in children. *Neurology*, 75 (19):e75-79.
- de Bot ST, Veldink JH, Vermeer S, Mensenkamp AR, Brugman F, Scheffer H, van den Berg LH, Kremer HP, Kamsteeg EJ, van de Warrenburg BP. 2013. ATL1 and REEP1 mutations in hereditary and sporadic upper motor neuron syndromes. *J Neurol*, 260 (3):869-875.
- Depienne C, Stevanin G, Brice A, Durr A. 2007. Hereditary spastic paraplegias: an update. *Curr Opin Neurol*, 20 (6):674-680.

- Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. 2009. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*, 37 (9):e67.
- Erichsen AK, Koht J, Stray-Pedersen A, Abdelnoor M, Tallaksen CM. 2009. Prevalence of hereditary ataxia and spastic paraplegia in southeast Norway: a population-based study. *Brain*, 132 (Pt 6):1577-1588.
- Fink JK. 2013. Hereditary spastic paraplegia: clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms. *Acta Neuropathol*, 126 (3):307-328.
- Finsterer J, Loscher W, Quasthoff S, Wanschitz J, Auer-Grumbach M, Stevanin G. 2012. Hereditary spastic paraplegias with autosomal dominant, recessive, X-linked, or maternal trait of inheritance. *J Neurol Sci*, 318 (1-2):1-18.
- Gaildrat P, Killian A, Martins A, Tournier I, Frebourg T, Tosi M. 2010. Use of splicing reporter minigene assay to evaluate the effect on splicing of unclassified genetic variants. *Methods Mol Biol*, 653:249-257.
- Gilbert W. 1978. Why genes in pieces? *Nature*, 271 (5645):501.
- Goizet C, Depienne C, Benard G, Boukhris A, Mundwiller E, Sole G, Couprie I, Pilliod J, Martin-Negrier ML, Fedirko E, Forlani S, Cazeneuve C, Hannequin D, Charles P, Feki I, Pinel JF, Ouvrard-Hernandez AM, Lyonnet S, Ollagnon-Roman E, Yaouanq J, Toutain A, Dussert C, Fontaine B, Leguern E, Lacombe D, Durr A, Rossignol R, Brice A, Stevanin G. 2011. REEP1 mutations in SPG31: frequency, mutational spectrum, and potential association with mitochondrial morpho-functional dysfunction. *Hum Mutat*, 32 (10):1118-1127.
- Guo J, Zhu P, Wu C, Yu L, Zhao S, Gu X. 2003. In silico analysis indicates a similar gene expression pattern between human brain and testis. *Cytogenet Genome Res*, 103 (1-2):58-62.
- Harding AE. 1983. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet*, 1 (8334):1151-1155.
- Hewamadduma C, McDermott C, Kirby J, Grierson A, Panayi M, Dalton A, Rajabally Y, Shaw P. 2009. New pedigrees and novel mutation expand the phenotype of REEP1-associated hereditary spastic paraplegia (HSP). *Neurogenetics*, 10 (2):105-110.
- Hurt CM, Bjork S, Ho VK, Gilsbach R, Hein L, Angelotti T. 2014. REEP1 and REEP2 proteins are preferentially expressed in neuronal and neuronal-like exocytotic tissues. *Brain Res*, 1545:12-22.
- Irobi J, Van den Bergh P, Merlini L, Verellen C, Van Maldergem L, Dierick I, Verpoorten N, Jordanova A, Windpassinger C, De Vriendt E, Van Gerwen V, Auer-Grumbach M, Wagner K, Timmerman V, De Jonghe P. 2004. The phenotype of motor neuropathies associated with BSCL2 mutations is broader than Silver syndrome and distal HMN type V. *Brain*, 127 (Pt 9):2124-2130.
- Jeffreys AJ, Flavell RA. 1977. The rabbit beta-globin gene contains a large large insert in the coding sequence. *Cell*, 12 (4):1097-1108.
- Jurica MS, Moore MJ. 2003. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol Cell*, 12 (1):5-14.
- Kuhlenbäumer, G., Ringelstein, E. B., Stögbauer, F., & Young, P. 2005. Chapter 8 -distal hereditary motor neuropathies. *Hereditary Peripheral Neuropathies*. Darmstadt: Steinkopff Verlag Darmstadt. 146-155.
- Landrieu, P., Baets, J. and Jonghe, P.D. 2013. Chapter 146 - Hereditary motor-sensory, motor, and sensory neuropathies in childhood. *Pediatric Neurology Part III*. O. Dulac, M. Lasseonde, and H.B. Sarnat, eds. Elsevier. 1413–1432.
- Long JC, Caceres JF. 2009. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem J*, 417 (1):15-27.

-
- Maniatis T, Tasic B. 2002. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature*, 418 (6894):236-243.
- Park SH, Zhu PP, Parker RL, Blackstone C. 2010. Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network. *J Clin Invest*, 120 (4):1097-1110.
- Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. 1997. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol*, 4 (3):311-323.
- Rossor AM, Kalmar B, Greensmith L, Reilly MM. 2012. The distal hereditary motor neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 83 (1):6-14.
- Saito H, Kubota M, Roberts RW, Chi Q, Matsunami H. 2004. RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors. *Cell*, 119 (5):679-691.
- Schlang KJ, Arning L, Epplen JT, Stemmler S. 2008. Autosomal dominant hereditary spastic paraplegia: novel mutations in the REEP1 gene (SPG31). *BMC Med Genet*, 9:71.
- Schlipf NA, Schule R, Klimpe S, Karle KN, Synofzik M, Schicks J, Riess O, Schols L, Bauer P. 2011. Amplicon-based high-throughput pooled sequencing identifies mutations in CYP7B1 and SPG7 in sporadic spastic paraplegia patients. *Clin Genet*, 80 (2):148-160.
- Schule R, Schols L. 2011. Genetics of hereditary spastic paraplegias. *Semin Neurol*, 31 (5):484-493.
- Smith PJ, Zhang C, Wang J, Chew SL, Zhang MQ, Krainer AR. 2006. An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum Mol Genet*, 15 (16):2490-2508.
- Verny C, Guegen N, Desquirit V, Chevrollier A, Prundean A, Dubas F, Cassereau J, Ferre M, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P, Procaccio V. 2011. Hereditary spastic paraplegia-like disorder due to a mitochondrial ATP6 gene point mutation. *Mitochondrion*, 11 (1):70-75.
- Will CL, Luhrmann R. 2011. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3 (7).
- Zuchner S, Wang G, Tran-Viet KN, Nance MA, Gaskell PC, Vance JM, Ashley-Koch AE, Pericak-Vance MA. 2006. Mutations in the novel mitochondrial protein REEP1 cause hereditary spastic paraplegia type 31. *Am J Hum Genet*, 79 (2):365-369.

9. Anhang

I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Übersicht, der für das Spleißen relevanten Komponenten der prä-mRNA	10
Abbildung 2 Wichtige Komponenten eines Minigen-Systems	11
Abbildung 3 Für <i>in-silico</i> -Analysen verwendete DNA-Sequenz (Wildtyp, 5'→3'), grau hinterlegt: Exon 5 des <i>REEPI</i> -Gens, weiß hinterlegt: Teile der benachbarten Introns 4+5.....	14
Abbildung 4 Struktur und Eigenschaften des TOPO-Vektors vor (A) und nach Klonierung (B).....	18
Abbildung 5 Struktur des pSPL3-Vektors vor und nach Klonierung und mögliche Auswirkungen der zu untersuchenden Varianten auf das Spleißen der prä-mRNA	19
Abbildung 6 Arbeitsschritte in chronologischer Reihenfolge	23
Abbildung 7 Ablauf der zielgerichteten Mutagenese mittels primärer (A) und sekundärer PCR (B) .	24
Abbildung 8 Vektoren und Inserts mit Primer-Hybridisierungsstellen für Kolonie-PCRs.....	25
Abbildung 9 Primer-Hybridisierungsstellen für die cDNA-PCR und die möglichen Auswirkungen der untersuchten Varianten auf das prä-mRNA-Spleißen und die Länge der mRNAs	26
Abbildung 10 TOPO- (A) und pSPL3-Vektor (B) mit Insert und Hybridisierungsstellen der Primer zur DNA-Sequenzierung	30
Abbildung 11 Restriktionsverdau von TOPO-Vektor mit Insert (A) und leerem pSPL3-Vektor (B)..	30
Abbildung 12 Spleißstellen der Wildtyp-Sequenz nach Analyse mit HSF	37
Abbildung 13 Spleißstellen der Variante c.304-2A>G nach Analyse mit HSF	37
Abbildung 14 Wichtige Spleißstellen der Variante c.366G>T nach Analyse mit HSF	38
Abbildung 15 Wichtige Spleißstellen der Variante c.417+1G>T nach Analyse mit HSF	38
Abbildung 16 Spleißstellen mit Lokalisation und Motiv nach Analyse mit Fruit Fly Splice Predictor	40
Abbildung 17 Exonische Spleißverstärker nach Analyse mit dem ESEfinder.....	42
Abbildung 18 Exonische Spleißverstärker nach Analyse mit RESCUE-ESE Web Server.....	43
Abbildung 19 Exemplarische Ergebnisse primärer PCRs nach Agarose-Gelelektrophorese (1,5%) ..	45
Abbildung 20 Exemplarische Ergebnisse sekundärer PCRs nach Agarose-Gelelektrophorese (1,5%)	46
Abbildung 21 Ergebnis der Kolonie-PCR (TOPO-Vektor) nach Agarose-Gelelektrophorese (1%) am Beispiel der Variante c.345C>A	47
Abbildung 22 Sequenzierung der Wildtyp-DNA (A) im Vergleich zur Variante c.320T>C (B)	47
Abbildung 23 DNA-Sequenzierung des Übergangs vom TOPO-Vektorgerüst zum Insert (Sequenz des Primers Intron 4_f mit der Restriktionsschnittstelle <i>EcoRI</i>)	48
Abbildung 24 Exemplarische Ergebnisse des Restriktionsverdaus von leerem pSPL3-Vektor und kloniertem TOPO-Vektor nach Agarose-Gelelektrophorese (1%)	48
Abbildung 25 Ergebnis der Kolonie-PCR (pSPL3-Vektor) nach Agarose-Gelelektrophorese (1%) am Beispiel der Variante c.337C>T	49

Abbildung 26 DNA-Sequenzierung des Übergangs vom pSPL3-Vektorgerüst zum Insert (Sequenz des Primers Intron 4_f mit der Restriktionsschnittstelle <i>EcoRI</i>)	50
Abbildung 27 Ergebnisse der cDNA-PCRs aller <i>REEPI</i> -Varianten, die ausschließlich in der.....	51
Abbildung 28 Ergebnisse der cDNA-PCRs aller <i>REEPI</i> -Varianten aus den Datenbanken	51
Abbildung 29 Auswirkungen der Variante c.304-2A>G auf das Spleißen von prä-mRNA	52
Abbildung 30 Auswirkungen der Variante c.345C>A auf das Spleißen von prä-mRNA.....	52
Abbildung 31 Auswirkungen der Variante c.366G>T auf das Spleißen von prä-mRNA	53
Abbildung 32 Auswirkungen der Variante c.417+1G>T auf das Spleißen von prä-mRNA.....	53

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Primer zur zielgerichteten Mutagenese mit Sequenz, Länge und Schmelztemperatur	16
Tabelle 2 Weitere Primer mit Sequenz, Länge und Schmelztemperatur	17
Tabelle 3 Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Enzyme mit genauer Bezeichnung und Name des Herstellers.....	19
Tabelle 4 Verwendete Kits mit Name des Herstellers und Angabe des Arbeitsschrittes	20
Tabelle 5 Verbrauchsmaterialien und Geräte mit Bezeichnung und Name des Herstellers	21
Tabelle 6 Zusammensetzung von Stammlösungen, Puffern, Gelen und Nährlösungen	21
Tabelle 7 <i>REEPI</i> -Varianten aus der Literatur mit ihren Eigenschaften	35
Tabelle 8 <i>REEPI</i> -Varianten aus den Datenbanken EVS und dbSNP mit ihren Eigenschaften.....	36
Tabelle 9 Spleißstellen der Wildtyp-Sequenz nach Analyse mit HSF.....	36
Tabelle 10 Vergleich der Spleißstellen nach Analyse durch HSF und Fruit Fly Splice Site Predictor	44
Tabelle 11 Vergleich der ESEs nach Analyse durch RESCUE-ESE Web Server und ESEfinder	44

III Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Christian Beetz dafür bedanken, dass ich meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen konnte und bei PD Dr. med. Klas Böer, dass er diese Dissertation betreut hat.

Während der Versuchsdurchführung im Labor standen mir Dr. Beetz sowie seine Mitarbeiterinnen Kerstin Stein und Annett Büschel tatkräftig zur Seite und waren bei Fragen und Problemen eine große Hilfe. Sie haben wesentlich dazu beigetragen, dass mir die Laborarbeit immer viel Freude bereitet hat.

Bei Susanne Schmidt möchte ich mich für ihr stets offenes Ohr, ihre Motivation, ihre konstruktiven Anregungen und vor allem für ihre langjährige Freundschaft bedanken.

Meinem Mann Erik danke ich von ganzem Herzen, dass er mich über die lange Zeit unterstützt und immer an mich geglaubt hat. Vor allem dann, wenn es grade nicht so gut voran gehen wollte oder mal wieder neue Hürden auftauchten. Seinen Rückhalt, sein Verständnis und seinen Optimismus hätte ich nicht missen wollen.

IV Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. Klas Böer, Dr. rer. nat. Christian Beetz, K. Stein, A. Büschel,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Freiberg, den 28.04.2019

.....

Annett Börner